



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0042902

(51)^{2021.01} C12N 15/11; C12R 1/865; C12N 9/00; (13) B
C12P 21/02; C12N 1/20; C12N 15/81

(21) 1-2022-07032

(22) 02/04/2021

(86) PCT/KR2021/004115 02/04/2021

(87) WO 2021/201643 07/10/2021

(30) 10-2020-0041184 03/04/2020 KR

(45) 27/01/2025 442

(43) 26/12/2022 417A1

(73) CJ CHEILJEDANG CORPORATION (KR)

330, Dongho-ro, Jung-gu, Seoul 04560, Republic of Korea

(72) HA, Cheol Woong (KR); IM, Yeong Eun (KR); YANG, Eun Bin (KR); KIM, Yeonsoo (KR); KIM, Hyung Joon (KR).

(74) Công ty TNHH Sáng chế ACTIP (ACTIP PATENT LIMITED)

(54) POLYNUCLEOTIT CÓ HOẠT TÍNH PROMOTƠ, CHẾ PHẨM, VECTƠ, VI SINH VẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT GLUTATHION SỬ DỤNG VI SINH VẬT NÀY

(21) 1-2022-07032

(57) Sáng chế đề cập đến polynucleotit có hoạt tính promotor, chế phẩm để biểu hiện gen chứa polynucleotit, vectơ chứa polynucleotit, vi sinh vật chứa polynucleotit, và phương pháp sản xuất glutathion sử dụng vi sinh vật này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến vùng gen khởi động (promotor), cụ thể hơn là đề cập đến polynucleotit có hoạt tính promotor, chế phẩm để biểu hiện gen chứa polynucleotit, vector chứa polynucleotit, vi sinh vật chứa polynucleotit, và phương pháp sản xuất glutathion sử dụng vi sinh vật này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Glutathion (GSH) là hợp chất lưu huỳnh hữu cơ thường có trong hầu hết các tế bào, là tripeptit gồm có ba axit amin: glyxin, glutamat, và xystein.

Glutathion có mặt trong cơ thể sống ở dạng glutathion khử (GSH) và ở dạng glutathion oxy hóa (GSSG). Dạng glutathion khử (GSH) có mặt với tỷ lệ tương đối cao trong các trường hợp bình thường, được phân bố chủ yếu trong các tế bào gan và da trong cơ thể con người và đóng vai trò quan trọng về chức năng chống oxy hóa trong việc phân hủy và loại bỏ oxy phản ứng, chức năng giải độc trong việc loại bỏ các hợp chất xenobiotic chẳng hạn như các chất độc hại, và chức năng làm trắng trong việc ức chế sản sinh melanin (Sipes IG *et al.*, “Vai trò của glutathion trong độc tính của các hợp chất xenobiotic: kích hoạt chuyển hóa của 1,2-đibromoetan bởi glutathion”, *Adv Exp Med Biol.* 1986;197:457–67).

Do sản sinh glutathion giảm dần do quá trình lão hóa tiến triển, và sự giảm sản sinh glutathion đóng vai trò quan trọng trong các chức năng chống oxy hóa và giải độc, thúc đẩy sự tích tụ của oxy phản ứng, là nguyên nhân chính gây lão hóa, nên cần phải cung cấp glutathion từ bên ngoài.

Có các chức năng khác nhau như mô tả bên trên, glutathion đã thu hút nhiều sự chú ý làm nguyên liệu trong các lĩnh vực khác nhau chẳng hạn như dược phẩm, thực phẩm chức năng y tế, mỹ phẩm, v.v., và còn được sử dụng trong việc điều chế các thành phần hương liệu, thực phẩm và các phụ gia thức ăn chăn nuôi. Đã biết rằng glutathion có tác dụng đáng kể trong việc tăng hương vị của nguyên liệu thô và duy trì hương vị đậm đà, và glutathion có thể được sử dụng như chất điều vị *kokumi* bằng cách sử dụng

đơn lẻ hoặc kết hợp với các chất khác. Thông thường, các chất *kokumi* có hương vị đậm đà hơn các chất *umami* hiện có chẳng hạn như axit nucleic, bột ngọt (Mononatri glutamat: MSG), v.v., và được biết là được tạo ra bởi sự phân hủy và lão hóa của protein.

Tuy nhiên, bất chấp việc tăng nhu cầu đối với glutathion để có thể sử dụng trong các lĩnh vực khác nhau, thị trường không được khích lệ đáng kể bởi vì đòi hỏi chi phí đáng kể cho sản xuất công nghiệp glutathion, do các quy trình tổng hợp enzym chưa được thương mại hóa vì chi phí cao, và các phương pháp chiết xuất glutathion từ các vi sinh vật cung cấp năng suất thấp.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất vùng gen khởi động mới, vector chứa vùng gen khởi động, vi sinh vật chứa vùng gen khởi động, và phương pháp sản xuất glutathion sử dụng vùng gen khởi động này.

Sáng chế đề xuất polynucleotit có hoạt tính promotor và ít nhất một nucleotit được lựa chọn từ nhóm gồm có các nucleotit thứ 92, 94, 102, 103, 249, và 251 của trình tự polynucleotit có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO:2 được thay thế bằng nucleotit khác.

Sáng chế đề xuất vector chứa polynucleotit có hoạt tính promotor.

Sáng chế đề xuất vi sinh vật thuộc chi *Saccharomyces* sp. chứa một hoặc nhiều polynucleotit có hoạt tính promotor và gen mã hóa protein đích; và vector chứa polynucleotit.

Sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất glutathion, phương pháp bao gồm nuôi cấy vi sinh vật trong môi trường nuôi cấy.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Trình tự vùng gen khởi động mới theo sáng chế tăng đáng kể việc sản sinh glutathion và do đó có thể được sử dụng trong sản xuất glutathion với năng suất cao.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết dưới đây. Trong khi đó, mỗi phần mô tả và phương án được bộc lộ trong đoạn mô tả này có thể được áp dụng cho các phần mô tả và các phương án khác. Nói cách khác, tất cả các sự kết hợp của các yếu tố khác nhau được

bộc lộ trong phần mô tả này nằm trong phạm vi bảo hộ của sáng chế. Ngoài ra, phạm vi bảo hộ của sáng chế không bị giới hạn bởi phần mô tả cụ thể bên dưới.

Người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật sẽ nhận thấy, hoặc có thể xác định chắc chắn bằng cách sử dụng không quá nhiều thử nghiệm thông thường, nhiều phương án tương đương với các phương án cụ thể của sáng chế được mô tả ở đây. Các phương án tương đương này được hiểu là nằm trong phạm vi bảo hộ của sáng chế.

Theo khía cạnh của sáng chế đề xuất polynucleotit có hoạt tính promotor (vùng gen khởi động) trong đó ít nhất một nucleotit được lựa chọn từ nhóm gồm có các nucleotit thứ 92, 94, 102, 103, 249, và 251 của trình tự polynucleotit có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2 được thay thế bằng nucleotit khác.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “polynucleotit” đề cập đến sợi ADN có chiều dài tối thiểu nhất định như polyme của các nucleotit trong đó các phân tử nucleotit được liên kết với nhau thành dạng chuỗi dài bằng các liên kết cộng hóa trị.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “polynucleotit có hoạt tính promotor” đề cập đến vùng ADN gần vị trí tại đó sự dịch mã của gen được biểu hiện, tức là, gen đích, khởi đầu, vùng bao gồm vị trí để polymeraza ARN, chất tăng cường, hoặc tương tự liên kết cho biểu hiện cho gen đích.

Polynucleotit có hoạt tính promotor của sáng chế có thể sử dụng làm promotor sử dụng chung để tăng cường.

Ví dụ, polynucleotit có thể được sử dụng làm promotor có khả năng tăng cường biểu hiện của polypeptit có hoạt tính glutamat-xystein ligaza. Hơn nữa, polynucleotit có thể là polynucleotit được sử dụng để tăng sản sinh hoặc sản xuất glutathion. Polynucleotit của sáng chế có thể bao gồm bất kỳ trình tự polynucleotit có hoạt tính promotor.

Theo sáng chế, trình tự polynucleotit có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2 có thể là trình tự có khả năng hoạt động như promotor của glutamat-xystein ligaza.

Tuy nhiên, trình tự polynucleotit có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2 là trình tự polynucleotit đại diện xác định vị trí của sửa đổi, và bất kỳ trình tự polynucleotit tương ứng với nó và có hoạt tính promotor có thể còn bao gồm trong các trình tự cho phép gây ra sửa đổi. Ví dụ, bất kỳ trình tự polynucleotit có khả năng hoạt

động như promotor của glutamat–xystein ligaza hoặc polypeptit có hoạt tính tương đương của nó có thể nằm trong phạm vi bảo hộ của sáng chế được đưa vào mà không bị giới hạn. Trong các trình tự nêu trên, khi ít nhất một trong các nucleotit tương ứng với các nucleotit thứ 92, 94, 102, 103, 249, và 251 có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2 được thay thế bằng nucleotit khác, promotor có hoạt tính cao hơn hoạt tính của trình tự promotor không thay thế (không sửa đổi) có thể được cung cấp.

Trình tự nucleotit có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2 có thể thu được từ cơ sở dữ liệu của Ngân hàng dữ liệu gen của Trung tâm Quốc gia về thông tin công nghệ sinh học (National Center for Biotechnology Information: NCBI GenBank). Các trình tự tương ứng với mã nhận biết SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2 và đóng vai trò làm promotor của glutamat–xystein ligaza có nguồn gốc từ vi sinh vật thuộc chi *Saccharomyces* sp., cụ thể là *Saccharomyces cerevisiae*, mà sáng chế không bị giới hạn ở đó, và có thể bao gồm bất kỳ trình tự có hoạt tính tương đương với hoạt tính của polynucleotit mà không bị giới hạn.

Theo sáng chế, polynucleotit có hoạt tính promotor có thể là trình tự polynucleotit có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2 hoặc trình tự polynucleotit có ít nhất 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% sự tương đồng hoặc đồng nhất với trình tự có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2, trong đó ít nhất một nucleotit được thay thế bằng nucleotit khác tại các vị trí cụ thể hoặc các vị trí tương ứng với nó. Trình tự polynucleotit có sự tương đồng hoặc đồng nhất có thể loại trừ trình tự có 100% sự đồng nhất hoặc có thể là trình tự có sự đồng nhất nhỏ hơn 100%.

Trong khi đó, mặc dù ‘polynucleotit có trình tự polynucleotit có mã nhận biết SEQ ID NO định trước’ và ‘polynucleotit chứa trình tự polynucleotit có mã nhận biết SEQ ID NO định trước’ được sử dụng trong sáng chế, hiển nhiên rằng bất kỳ polynucleotit có trình tự polynucleotit bao gồm xóa, sửa đổi, thay thế hoặc bổ sung một hoặc một số nucleotit cũng có thể được sử dụng trong sáng chế, miễn là polynucleotit có hoạt tính đồng nhất hoặc tương đương với hoạt tính của polynucleotit chứa trình tự polynucleotit có mã nhận biết SEQ ID NO định trước.

Ví dụ, rõ ràng rằng bất kỳ polynucleotit bao gồm việc bổ sung trình tự vô nghĩa bên trong hoặc tại đầu của trình tự polynucleotit có mã nhận biết SEQ ID NO định trước hoặc xóa một phần của trình tự polynucleotit có mã nhận biết SEQ ID NO định trước

bên trong hoặc tại một đầu của nó cũng có thể nằm trong phạm vi bảo hộ của sáng chế, miễn là polynucleotit có hoạt tính đồng nhất hoặc tương đương với hoạt tính của polynucleotit của sáng chế.

Sự tương đồng và đồng nhất đề cập đến mức độ phù hợp giữa hai trình tự axit amin hoặc trình tự nucleotit đã cho, và có thể được thể hiện bằng tỷ lệ phần trăm.

Các thuật ngữ “tương đồng” và “đồng nhất” thường có thể được sử dụng thay thế cho nhau.

Sự tương đồng hoặc đồng nhất trình tự của các polynucleotit bảo thủ có thể được xác định bằng thuật toán căn chỉnh tiêu chuẩn, và các hàm phạt khoảng trống mặc định được thiết lập bằng chương trình đang sử dụng có thể được sử dụng cùng nhau. Về cơ bản, các trình tự tương đồng hoặc đồng nhất có thể được lai hóa với nhau cho ít nhất khoảng 50%, 60%, 70%, 80%, hoặc 90% của toàn bộ trình tự hoặc toàn bộ chiều dài trong các điều kiện nghiêm ngặt cao. Trong polynucleotit đã lai hóa, polynucleotit chứa các đơn vị mã hóa (codon) thoái biến thay cho các codon trong phép lai có thể được xem xét.

Sự tương đồng, tương tự, hoặc đồng nhất trình tự giữa hai trình tự polynucleotit đã cho có thể được xác định bằng cách sử dụng các thuật toán máy tính đã biết chẳng hạn như chương trình “FASTA”, bằng cách sử dụng các tham số mặc định được giới thiệu bởi Pearson *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444). Ngoài ra, thuật toán Needleman–Wunsch (Needleman và Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48:443–453) được triển khai trong chương trình Needleman của gói EMBOSS (EMBOSS: Bộ phần mềm mở phân tử sinh học châu Âu, Rice *et al.*, 2000, *Trends Gent.* 16:276–277) (phiên bản 5.0.0 hoặc phiên bản cao hơn) (bao gồm gói chương trình GCG (Devereux, J. *et al.*, Nghiên cứu các axit nucleic 12:387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, S. F., *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215: 403 (1990); Hướng dẫn cho các máy tính lớn, Martin J. Bishop, ed., Academic Press, San Diego, 1994, và CARILLO *et al.* (1988) *SIAM J Applied Math* 48:1073). Ví dụ, sự tương đồng, tương tự, hoặc đồng nhất có thể được xác định bằng cách sử dụng BLAST của cơ sở dữ liệu thông tin của Trung tâm quốc gia công nghệ sinh học, hoặc ClustalW.

Sự tương đồng, tương tự, hoặc đồng nhất giữa các polynucleotit có thể được xác định bằng cách so sánh thông tin trình tự sử dụng chương trình máy tính GAP như được

đưa ra bởi Needleman *et al.*, (1970), *J Mol Biol.* 48:443 được bộc lộ bởi Smith và Waterman, *Adv. Appl. Math* (1981) 2:482. Tóm lại, chương trình GAP định nghĩa sự tương tự là số lượng các ký hiệu được căn chỉnh (tức là, các nucleotit hoặc các axit amin) là tương tự, được chia cho tổng số các ký tự trong trình tự ngắn hơn trong hai trình tự. Các tham số mặc định đối với chương trình GAP có thể bao gồm: (1) ma trận so sánh nhị phân (bao gồm giá trị 1 đối với đồng nhất và giá trị 0 đối với không đồng nhất) và ma trận so sánh trọng số của Gribskov *et al.* (1986), *Nucl. Acids Res.* 14:6745 như được mô tả bởi Schwartz và Dayhoff, eds., Bản đồ trình tự và cấu trúc protein, Quỹ nghiên cứu y sinh quốc gia, trang 353–358 (1979) (hoặc ma trận thay thế EADNFULL (phiên bản EMBOSS của NCBI NUC4.4)); (2) hàm phạt bằng 3,0 đối với mỗi khoảng trống dịch chuyển và hàm phạt bổ sung 0,10 đối với mỗi ký tự trong mỗi khoảng trống dịch chuyển (hoặc hàm phạt mở khoảng trống dịch chuyển bằng 10 và hàm phạt mở rộng khoảng trống dịch chuyển bằng 0,5); và (3) không có hàm phạt đối với các khoảng trống dịch chuyển cuối. Do đó, như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “tương đồng” hoặc “đồng nhất” chỉ ra mối liên hệ giữa các trình tự.

Ngoài ra, polynucleotit có thể bao gồm bất kỳ đầu dò được điều chế từ bất kỳ các trình tự gen đã biết, ví dụ, trình tự polynucleotit được lai hóa với trình tự bổ sung toàn bộ hoặc một phần vào trình tự polynucleotit được mô tả bên trên dưới các điều kiện nghiêm ngặt và có cùng hoạt tính mà không bị giới hạn. Thuật ngữ “các điều kiện nghiêm ngặt” đề cập đến các điều kiện cho phép sự lai hóa đặc hiệu giữa các polynucleotit. Các điều kiện như vậy đã được mô tả chi tiết trong các tài liệu đã biết (ví dụ, J. Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, tái bản lần hai, ấn phẩm Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989; F. M. Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., New York). Ví dụ, các điều kiện nghiêm ngặt có thể bao gồm thực hiện lai hóa giữa các gen có sự tương đồng hoặc đồng nhất cao, ví dụ, sự tương đồng hoặc đồng nhất là 40% hoặc tốt hơn là tối thiểu 70%, tối thiểu 80%, tối thiểu 85%, hoặc tối thiểu 90%, tốt hơn nữa là tối thiểu 95%, tốt hơn nữa là tối thiểu 97%, và tốt nhất là tối thiểu 99%, mà không thực hiện lai hóa giữa các gen có sự tương đồng hoặc đồng nhất thấp hơn sự tương đồng hoặc đồng nhất bên trên, hoặc rửa một lần, tốt hơn là hai hoặc ba lần, dưới các điều kiện rửa thông thường cho phép lai Southern ở nồng độ muối và nhiệt độ là 60°C, 1×SSC, và 0,1% SDS, tốt hơn là 60°C, 0,1×SSC, 0,1% SDS, và tốt hơn nữa là 68°C, 0,1×SSC, và 0,1% SDS.

Sự lai hóa đòi hỏi hai polynucleotit có các trình tự bổ sung, mặc dù tùy thuộc vào mức độ nghiêm ngặt của phép lai, sự không khớp giữa các bazơ là có thể. Thuật ngữ “bổ sung” được sử dụng để mô tả mối quan hệ giữa các bazơ của các nucleotit có khả năng lai hóa với nhau. Ví dụ, đối với ADN, adenosin được bổ sung với thymine, và xytosin được bổ sung với guanin. Do đó, sáng chế có thể không chỉ bao gồm trình tự axit amin giống nhau về cơ bản mà còn các đoạn axit nucleic được phân lập nhưng bổ sung cho toàn bộ trình tự.

Cụ thể, các polynucleotit có sự tương đồng hoặc đồng nhất có thể được phát hiện bằng cách sử dụng các điều kiện lai hóa được mô tả bên trên bao gồm quá trình lai hóa ở giá trị T_m là 55°C. Ngoài ra, giá trị T_m có thể là nhưng không giới hạn ở 60°C, 63°C, hoặc 65°C, và có thể được điều chỉnh thích hợp bởi người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật tùy thuộc vào mục đích sử dụng.

Độ nghiêm ngặt thích hợp để lai các polynucleotit có thể phụ thuộc vào độ dài và mức độ bổ sung của các polynucleotit, và các thông số của nó đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật (tham khảo Sambrook *et al.*, *supra*, 9.50–9.51, 11.7–11.8).

Polynucleotit có hoạt tính promotơ được cung cấp bởi sáng chế có thể có hoạt tính promotơ được tăng cường bằng cách thay thế nucleotit tại vị trí cụ thể của trình tự polynucleotit được mô tả bên trên có hoạt tính promotơ.

Theo phương án của sáng chế, polynucleotit có hoạt tính promotơ của sáng chế có thể bao gồm polynucleotit có hoạt tính promotơ trong đó ít nhất một nucleotit của trình tự nucleotit có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2 được thay thế bằng nucleotit khác. Cụ thể, polynucleotit có thể bao gồm polynucleotit có hoạt tính promotơ trong đó ít nhất một nucleotit của trình tự nucleotit có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2 được thay thế bằng nucleotit khác. Polynucleotit có hoạt tính promotơ có thể được sử dụng thay thế cho “promotơ đột biến” theo sáng chế. Promotơ đột biến có thể là promotơ trong đó nucleotit được thay thế bằng nucleotit khác tại một hoặc nhiều vị trí, hai hoặc nhiều vị trí, ba hoặc nhiều vị trí, bốn hoặc nhiều vị trí, năm hoặc nhiều vị trí, hoặc toàn bộ sáu vị trí, hoặc các vị trí tương ứng của chúng.

Theo phương án của sáng chế, polynucleotit có hoạt tính promotơ có thể là polynucleotit chứa trình tự polynucleotit có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2 trong đó ít nhất một nucleotit được lựa chọn từ nhóm gồm có các nucleotit thứ

92, 94, 102, 103, 249, và 251 được thay thế bằng nucleotit khác và có hoạt tính promotor.

“Nucleotit khác” không bị giới hạn cụ thể miễn là nucleotit sau khi thay thế khác với trước khi thay thế. Ví dụ, khi nucleotit thứ 92 chứa thymine (T) trong trình tự polynucleotit có mã nhận biết SEQ ID NO: 1, cách diễn tả “nucleotit thứ 92 có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 được thay thế bằng nucleotit khác” có nghĩa rằng thymine (T) được thay thế bằng cytosine (C), adenine (A), hoặc guanine (G) khác với thymine (T). Theo sáng chế, khi nucleotit được “thay thế”, nucleotit được thay thế bằng nucleotit khác mà khác với nucleotit trước khi thay thế trừ khi có quy định khác.

Trong khi đó, người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật sẽ xác định các nucleotit ở các vị trí tương ứng với các nucleotit thứ 92, 94, 102, 103, 249, và 251 của trình tự polynucleotit có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2 của sáng chế theo trình tự polynucleotit tùy ý bằng cách căn chỉnh trình tự đã biết đến trong cùng lĩnh vực kỹ thuật, và hiển nhiên rằng cách diễn tả “nucleotit tại vị trí cụ thể có mã nhận biết SEQ ID NO: cụ thể” bao gồm “nucleotit tại vị trí tương ứng với nó” trong trình tự polynucleotit tùy ý trừ khi có quy định khác theo sáng chế. Do đó, bất kỳ trình tự polynucleotit của polynucleotit có hoạt tính promotor, trong đó ít nhất một nucleotit được lựa chọn từ nhóm gồm có các nucleotit tương ứng với các nucleotit thứ 92, 94, 102, 103, 249, và 251 của trình tự polynucleotit có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2 được thay thế bằng nucleotit khác, thuộc vào phạm vi bảo hộ của sáng chế.

“Các vị trí thứ 92, 94, 102, 103, 249, và 251 có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2” lần lượt nằm ở 409 nt, 407 nt, 399 nt, 398 nt, 252 nt, và 250 nt phía trước từ A, làm điểm chuẩn (0) của ATG, là đơn vị mã hóa khởi đầu trong các polynucleotit có hoạt tính promotor có nguồn gốc từ các chủng *Saccharomyces cerevisiae* CEN KSD-Yc, YJM1450, YJM1401, YJM1307, và chủng được nộp lưu chủng theo Hiệp ước Budapest vào Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc (Korean Culture Center of Microorganisms: KCCM) với số lưu chủng KCCM12568P, tức là, theo mã nhận biết SEQ ID NO: 2, và do đó các vị trí có thể quy định như các vị trí thứ -409, -407, -399, -398, -252, và -250, tương ứng, phía trước từ khung đọc mở (open reading frame: ORF) theo phương pháp thường được sử dụng trong cùng lĩnh vực kỹ thuật.

Trong khi đó, đối với polynucleotit có hoạt tính promotor có nguồn gốc từ *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK1-D, tức là, SEQ ID NO: 1, trong đó nucleotit tại vị trí thứ 74 phía trước từ ORF (tức là, vị trí thứ -74) bị xóa trong trình tự promotor của *Saccharomyces cerevisiae* CEN KSD-Yc, “các vị trí thứ 92, 94, 102, 103, 249, và 251 có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2” lần lượt tương ứng với các vị trí thứ -408, -406, -398, -397, -251, và -249 phía trước từ ORF.

Theo phương án của sáng chế, polynucleotit có hoạt tính promotor của sáng chế có thể là polynucleotit trong đó ít nhất một nucleotit được lựa chọn từ nhóm gồm có các nucleotit thứ 92, 94, 102, 103, 249, và 251 của trình tự polynucleotit có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2 được thay thế bằng nucleotit khác.

Cụ thể, theo sáng chế, polynucleotit có hoạt tính promotor có thể là polynucleotit trong đó hai hoặc nhiều nucleotit được lựa chọn từ nhóm gồm có các nucleotit thứ 92, 94, 102, 103, 249, và 251 của trình tự polynucleotit có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2 được thay thế bằng các nucleotit khác.

Cụ thể, theo sáng chế, polynucleotit có hoạt tính promotor có thể là polynucleotit trong đó bốn hoặc nhiều nucleotit được lựa chọn từ nhóm gồm có các nucleotit thứ 92, 94, 102, 103, 249, và 251 của trình tự polynucleotit có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2 được thay thế bằng các nucleotit khác.

Cụ thể, polynucleotit có thể là polynucleotit trong đó toàn bộ sáu nucleotit được lựa chọn từ nhóm gồm có các nucleotit thứ 92, 94, 102, 103, 249, và 251 của trình tự polynucleotit có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2 được thay thế bằng các nucleotit khác.

Theo phương án của sáng chế, polynucleotit có hoạt tính promotor có thể là polynucleotit trong đó các nucleotit thứ 249 và 251 của trình tự polynucleotit có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2 được thay thế bằng các nucleotit khác.

Theo phương án của sáng chế, polynucleotit có hoạt tính promotor có thể là polynucleotit trong đó các nucleotit thứ 92, 94, 102, và 103 của trình tự polynucleotit có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2 được thay thế bằng các nucleotit khác.

Tuy nhiên, sáng chế không giới hạn ở đó.

Theo phương án của sáng chế, polynucleotit có hoạt tính promotor có thể bao gồm:

sự thay thế thymin (T) ở vị trí thứ 92 bằng guanin (G), xytoxin (C), hoặc adenin (A);

sự thay thế thymin (T) ở vị trí thứ 94 bằng guanin (G), xytoxin (C), hoặc adenin (A);

sự thay thế adenin (A) ở vị trí thứ 102 bằng guanin (G), xytoxin (C), hoặc thymin (T);

sự thay thế adenin (A) ở vị trí thứ 103 bằng guanin (G), xytoxin (C), hoặc thymin (T);

sự thay thế guanin (G) ở vị trí thứ 249 bằng thymin (T), xytoxin (C), hoặc adenin (A);

sự thay thế xytoxin (C) ở vị trí thứ 251 bằng thymin (T), guanin (G), hoặc adenin (A); hoặc bất kỳ sự kết hợp của chúng trong trình tự polynucleotit có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2,

Theo phương án của sáng chế, thymin (T) ở vị trí thứ 92 có thể được thay thế bằng xytoxin (C). Điều này cũng có thể được biểu diễn như 92 (T→C) hoặc -409 (T→C), và theo trình tự tham chiếu là -408 (T→C).

Theo phương án của sáng chế, thymin (T) ở vị trí thứ 94 có thể được thay thế bằng xytoxin (C). Điều này cũng có thể được biểu diễn như 94 (T→C) hoặc -407 (T→C), và theo trình tự tham chiếu là -406 (T→C).

Theo phương án của sáng chế, adenin (A) ở vị trí thứ 102 có thể được thay thế bằng xytoxin (C). Điều này cũng có thể được biểu diễn như 102 (A→C) hoặc -399 (A→C), và theo trình tự tham chiếu là -398 (A→C).

Theo phương án của sáng chế, adenin (A) ở vị trí thứ 103 có thể được thay thế bằng thymin (T). Điều này cũng có thể được biểu diễn như 103 (A→T) hoặc -398 (A→T), và theo trình tự tham chiếu là -397 (A→T).

Theo phương án của sáng chế, guanin (G) ở vị trí thứ 249 có thể được thay thế bằng adenin (A). Điều này cũng có thể được biểu diễn như 249 (G→A) hoặc -252 (G→A), và theo trình tự tham chiếu là -251 (G→A).

Theo phương án của sáng chế, xytoxin (C) ở vị trí thứ 251 có thể được thay thế

bằng thymine (T). Điều này cũng có thể được biểu diễn như 251 (C→T) hoặc -250 (C→T), và theo trình tự tham chiếu là -249 (C→T).

Theo phương án của sáng chế, polynucleotit có hoạt tính promotor có thể bao gồm ít nhất một trong các sự thay thế ở 92 (T→C), 94 (T→C), 102 (A→C), 103 (A→T), 249 (G→A), và 251 (C→T).

Theo phương án của sáng chế, polynucleotit có hoạt tính promotor có thể bao gồm các sự thay thế ở 249 (G→A) và 251 (C→T).

Theo phương án của sáng chế, polynucleotit có hoạt tính promotor có thể bao gồm các sự thay thế ở 92 (T→C), 94 (T→C), 102 (A→C), và 103 (A→T).

Theo phương án của sáng chế, polynucleotit có hoạt tính promotor có thể bao gồm tất cả các sự thay thế ở 92 (T→C), 94 (T→C), 102 (A→C), 103 (A→T), 249 (G→A), và 251 (C→T).

Theo phương án của sáng chế, polynucleotit có hoạt tính promotor có thể bao gồm ít nhất một trình tự polynucleotit được lựa chọn từ trình tự có mã nhận biết từ SEQ ID NO: 3 đến SEQ ID NO: 32. Cụ thể, polynucleotit có thể bao gồm một trình tự polynucleotit được lựa chọn từ các trình tự có mã nhận biết từ SEQ ID NO: 3 đến SEQ ID NO: 32, mà sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Như mô tả bên trên, mặc dù cách diễn tả ‘polynucleotit có trình tự nucleotit có mã nhận biết SEQ ID NO: cụ thể’ hoặc ‘polynucleotit chứa trình tự nucleotit có mã nhận biết SEQ ID NO: cụ thể’ được sử dụng trong sáng chế, hiển nhiên rằng bất kỳ polynucleotit có trình tự nucleotit bao gồm xóa, sửa đổi, thay thế, hoặc bổ sung một hoặc một số nucleotit cũng có thể được sử dụng trong sáng chế miễn là polynucleotit có hoạt tính đồng nhất hoặc tương đương với hoạt tính của polynucleotit chứa trình tự nucleotit có mã nhận biết SEQ ID NO cụ thể.

Ngoài ra, sáng chế không giới hạn ở các phương án được mô tả bên trên, và trình tự polynucleotit có thể bao gồm các biến đổi khác nhau trong phạm vi không làm giảm đáng kể hoạt tính promotor.

Polynucleotit có hoạt tính promotor theo sáng chế có thể được sử dụng làm promotor.

Promotor có thể nằm ở vùng 5' của vị trí bắt đầu phiên mã mRNA.

Promotor có thể có hoạt tính promotor được tăng cường so với các promotor thông

thường. Tức là, promotor có thể không chỉ làm tăng biểu hiện của gen đích trong các tế bào chủ, mà còn biểu hiện và/hoặc hoạt tính của protein được mã hóa bởi gen đích. Theo mục đích của sáng chế, gen đích để tăng cường biểu hiện có thể được sửa đổi theo sản phẩm cần thu được, và promotor có thể được sử dụng làm promotor sử dụng chung để tăng cường gen đích.

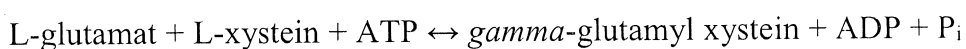
“Gen đích” đề cập đến gen, sự biểu hiện của gen này được điều chỉnh bằng trình tự promotor của sáng chế theo mục đích của sáng chế. Protein được mã hóa bởi gen đích có thể đề cập đến như “protein đích”, và gen mã hóa “protein đích” có thể được đề cập đến là “gen đích”.

Ngoài ra, polynucleotit mã hóa protein đích có thể có nhiều sửa đổi khác nhau được thực hiện trong vùng mã hóa với điều kiện không làm thay đổi trình tự axit amin của protein được biểu hiện từ vùng mã hóa do sự thoái biến đơn vị mã hóa hoặc xem xét đến các đơn vị mã hóa được ưu tiên bởi các vi sinh vật sống trong đó polynucleotit được biểu hiện. Các phần mô tả của trình tự polynucleotit được mô tả bên trên.

Theo phương án của sáng chế, protein đích có thể là polypeptit có hoạt tính glutamat–xystein ligaza. Tức là, gen đích của promotor có thể là gen mã hóa polypeptit có glutamat–xystein ligaza.

Theo sáng chế, “glutamat–xystein ligaza” là enzym còn được đề cập đến là “enzym liên kết glutamat–xystein”, “*gamma*-glutamyl xystein synthetaza (GCS)”, hoặc “protein GSH1”.

Glutamat–xystein ligaza được biến đổi là chất xúc tác cho phản ứng sau đây:



Ngoài ra, phản ứng được xúc tác bởi glutamat–xystein ligaza được gọi là bước thứ nhất trong quá trình tổng hợp glutathion.

Trình tự axit amin cấu thành glutamat–xystein ligaza có thể thu được từ cơ sở dữ liệu đã biết của NCBI GenBank. Ví dụ, glutamat–xystein ligaza có thể có nguồn gốc từ *Saccharomyces cerevisiae*. Ví dụ, glutamat–xystein ligaza có thể là protein chứa trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 33, nhưng có thể bao gồm bất kỳ trình tự có hoạt tính giống như trình tự axit amin, nhưng sáng chế không giới hạn ở đây.

Ngoài ra, “polypeptit có hoạt tính glutamat–xystein ligaza” của sáng chế có thể

bao gồm không chỉ dạng kiểu hoang dã, không sửa đổi, hoặc xảy ra trong tự nhiên của glutamat–xystein ligaza, mà còn các biến thể có hoạt tính glutamat–xystein ligaza giống hoặc được tăng cường.

Theo sáng chế, “polypeptit đã sửa đổi” có cùng nghĩa với “biến thể”, có thể đề cập đến protein thu được bằng cách thay thế bảo thủ và/hoặc sửa đổi ít nhất một axit amin khác với axit amin của trình tự được đề cập trong khi vẫn duy trì chức năng hoặc đặc tính của protein. Ví dụ, polypeptit đã sửa đổi có thể là biến thể trong đó axit amin ở vị trí thứ 86 từ đầu tận cùng N có mã nhận biết SEQ ID NO: 33 được thay thế bằng gốc axit amin khác không phải là xystein trong glutamat–xystein ligaza được mô tả ở trên.

Biến thể khác biệt với trình tự được xác định bằng cách thay thế, xóa hoặc thêm vào một vài axit amin. Các biến thể như vậy có thể thu được bằng cách sửa đổi một hoặc nhiều axit amin trong trình tự axit amin của protein ở trên và được xác định bằng cách đánh giá đặc tính của protein đã sửa đổi. Tức là, khả năng của biến thể có thể được tăng cường so với protein bản địa. Ngoài ra, một số biến thể có thể bao gồm các biến thể từ đó ít nhất một phần như trình tự dẫn đầu đầu tận cùng N hoặc miền xuyên màng đã được loại bỏ. Các biến thể khác có thể bao gồm các biến thể trong đó một phần được loại bỏ khỏi đầu tận cùng N hoặc C của protein trưởng thành.

Thuật ngữ “biến thể” còn có thể được sử dụng thay thế cho các thuật ngữ khác như sửa đổi, protein đã sửa đổi, polypeptit đã sửa đổi, đột biến, mutein và dị biệt, và bất kỳ thuật ngữ nào được sử dụng để chỉ sự biến đổi cũng có thể được sử dụng không giới hạn. Theo mục đích của sáng chế, biến thể có thể có hoạt tính tăng cường so với các protein kiểu hoang dã hoặc không bị sửa đổi, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “thay thế bảo thủ” có nghĩa là sự thay thế một axit amin bằng axit amin khác có cùng đặc tính cấu trúc và/hoặc đặc tính hóa học. Biến thể có thể có ít nhất một sự thay thế bảo thủ trong khi vẫn duy trì ít nhất một hoạt tính sinh học. Sự thay thế axit amin như vậy thường có thể xảy ra dựa trên sự tương tự về độ phân cực, điện tích, tính hòa tan, tính kỵ nước, tính ưa nước, và/hoặc bản chất lưỡng tính của gốc.

Các biến thể cũng có thể bao gồm việc xóa hoặc bổ sung các axit amin có ảnh hưởng tối thiểu đến đặc tính và cấu trúc bậc hai của polypeptit. Ví dụ, polypeptit có thể được liên hợp với trình tự tín hiệu (hoặc trình tự dẫn đầu) tại đầu tận cùng N của protein

mà chuyển hướng đồng dịch mã hoặc sau dịch mã của protein. Polypeptit cũng có thể được liên hợp với trình tự hoặc trình tự liên kết khác để xác định, tinh chế hoặc tổng hợp polypeptit.

Theo sáng chế, “được thay thế bằng axit amin khác” không bị giới hạn cụ thể miễn là axit amin sau thay thế khác với axit amin trước thay thế. Tức là, sự thay thế xystein, là axit amin thứ 86 từ đầu tận cùng N của trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 33, bằng axit amin không phải là xystein cũng có thể được gọi là “sự thay thế của axit amin thứ 86 bằng axit amin khác”. Trong khi đó, theo sáng chế, rõ ràng khi cách diễn tả “axit amin định trước được thay thế” có nghĩa rằng axit amin sau thay thế khác với axit amin trước thay thế trừ khi cách diễn tả “được thay thế bằng axit amin khác” được sử dụng.

“Biến thể glutamat–xystein ligaza” của sáng chế cũng có thể đề cập đến “polypeptit (đã sửa đổi) có hoạt tính glutamat–xystein ligaza” hoặc “biến thể GSH1” mà có thể tăng lượng sản sinh glutathion so với protein trước sửa đổi, polypeptit kiểu hoang dã, hoặc polypeptit không sửa đổi, mà sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Trong biến thể, ít nhất một axit amin của trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 33 có thể được thay thế bằng axit amin khác. Cụ thể, biến thể có thể bao gồm sự thay thế axit amin tương ứng với vị trí thứ 86 của trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 33 bằng axit amin khác. Axit amin khác có thể được lựa chọn từ glyxin, alanin, valin, leuxin, isoleuxin, metionin, phenylalanin, tryptophan, prolin, serin, threonin, tyrosin, asparagin, glutamat, glutamin, aspartat, lysin, arginin, và histidin.

Theo phương án của sáng chế, axit amin tương ứng với vị trí thứ 86 của trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 33 có thể được thay thế bằng arginin, mà sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Theo sáng chế, hiển nhiên là “biến thể trong đó axit amin thứ 86 từ đầu tận cùng N của trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 33 được thay thế bằng axit amin khác” bao gồm biến thể trong đó axit amin tương ứng với vị trí thứ 86 của trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 33 được thay thế bằng axit amin khác, mặc dù axit amin ở vị trí khác với vị trí thứ 86 do xóa/thêm/chèn vào hoặc tương tự đối với axit amin ở đầu tận cùng N hoặc C hay ở giữa của trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 33. Ngoài ra, mặc dù biến thể, trong đó axit amin thứ 86 từ đầu tận cùng N của

trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 33 được thay thế bằng axit amin khác, được mô tả làm ví dụ của biến thể glutamat–xystein ligaza của sáng chế, hiển nhiên rằng biến thể glutamat–xystein ligaza của sáng chế không bị hạn chế ở biến thể của trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 33, và biến thể trong đó axit amin tương ứng với vị trí 86 của trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 33 được thay thế bằng axit amin khác trong trình tự axit amin bất kỳ có hoạt tính của glutamat–xystein ligaza cũng nằm trong phạm vi của biến thể glutamat–xystein ligaza theo sáng chế. Trong trình tự axit amin bất kỳ, “axit amin tương ứng với vị trí thứ 86 của trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 33” có thể được xác định bằng các phương pháp căn chỉnh trình tự khác nhau đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật.

Biến thể glutamat–xystein ligaza của sáng chế trong đó axit amin tương ứng với vị trí thứ 86 từ đầu tận cùng N của trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 33 được thay thế bằng axit amin khác có thể là protein chứa trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 33 hoặc trình tự axit amin có ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% tương đồng hoặc đồng nhất với nó. Ngoài ra, hiển nhiên rằng bất kỳ protein có trình tự axit amin bao gồm việc xóa, sửa đổi, thay thế hoặc thêm vào một hoặc một vài axit amin ở vị trí khác với vị trí thứ 86 vẫn thuộc phạm vi của sáng chế miễn là protein vẫn duy trì sự tương đồng hoặc đồng nhất như mô tả ở trên và có hiệu quả tương đương với biến thể. Sự tương đồng và đồng nhất đã được mô tả ở phần trên.

Gen mã hóa polypeptit có hoạt tính glutamat–xystein ligaza của sáng chế có thể gọi là “gen GSH1”.

Gen này có thể có nguồn gốc từ nấm men. Cụ thể, gen này có thể có nguồn gốc từ vi sinh vật thuộc chi *Saccharomyces*, cụ thể hơn là *Saccharomyces cerevisiae*. Cụ thể, gen có thể là gen mã hóa trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 33, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Theo sáng chế, “gen GSH1”, tức là, polynucleotit mã hóa polypeptit có hoạt tính glutamat–xystein ligaza, có thể có các sửa đổi khác nhau được thực hiện trong vùng mã hóa với điều kiện không làm thay đổi trình tự axit amin của polypeptit được biểu hiện từ vùng mã hóa do thoái biến codon hoặc xem xét các codon được ưa thích bởi sinh vật sống trong đó polynucleotit được biểu hiện.

Vì polypeptit có hoạt tính glutamat–xystein ligaza theo sáng chế cũng bao gồm các

trình tự của các biến thể, bất kỳ trình tự polynucleotit nào mã hóa các biến thể protein trong đó axit amin ở vị trí thứ 86 của trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 33 của sáng chế được thay thế bằng axit amin khác cũng có thể bao gồm mà không bị giới hạn.

Ngoài ra, polynucleotit có thể bao gồm trình tự polynucleotit được lai hóa với đầu dò được điều chế bằng cách sử dụng trình tự gen đã biết, ví dụ, trình tự polynucleotit bổ sung hoàn toàn hoặc một phần cho trình tự polynucleotit trong các điều kiện nghiêm ngặt để mã hóa biến thể protein, trong đó axit amin tương ứng với vị trí thứ 86 của trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 33 được thay thế bằng axit amin khác, mà không bị giới hạn.

Theo khía cạnh khác của sáng chế đề xuất chế phẩm để biểu hiện gen, chế phẩm này bao gồm polynucleotit có hoạt tính promotor theo sáng chế.

Chế phẩm để biểu hiện gen đề cập đến chế phẩm có khả năng biểu hiện gen bằng cách sử dụng polynucleotit có hoạt tính promotor theo sáng chế.

Ví dụ, chế phẩm để biểu hiện gen bao gồm polynucleotit có hoạt tính promotor theo sáng chế, và có thể còn bao gồm bất kỳ thành phần nào khác có khả năng hoạt động polynucleotit như promotor.

Trong chế phẩm để biểu hiện gen theo sáng chế, polynucleotit có thể ở dạng có trong vector cho phép biểu hiện gen được liên kết chức năng với nó trong tế bào chủ.

Theo khía cạnh khác của sáng chế đề xuất vector, vector này bao gồm polynucleotit có hoạt tính promotor hoặc polynucleotit và gen mã hóa protein đích.

Theo phương án của sáng chế, protein đích có thể là polypeptit có hoạt tính glutamat-xystein ligaza.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “vector” đề cập đến cấu trúc ADN bao gồm trình tự polynucleotit mã hóa protein đích, được liên kết chức năng với trình tự điều hòa thích hợp để biểu hiện protein đích trong tế bào chủ thích hợp.

Theo mục đích của sáng chế, trình tự điều hòa có thể bao gồm polynucleotit có hoạt tính promotor theo sáng chế.

Trong khi đó, trình tự điều hòa có thể bao gồm promotor để bắt đầu phiên mã, trình tự vận hành để điều chỉnh phiên mã, trình tự mã hóa vị trí liên kết ribosom mRNA thích

hợp và trình tự điều hòa kết thúc phiên mã và dịch mã. Sau khi vector được đưa vào tế bào chủ thích hợp, nó có thể sao chép hoặc hoạt động độc lập với bộ gen chủ và có thể được tích hợp vào bộ gen.

Vector được sử dụng trong sáng chế không bị giới hạn cụ thể, và bất kỳ vector đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật đều có thể được sử dụng. Như vector được biểu hiện trong nấm men, cả hai plasmid nấm men tích hợp (YIp) và plasmid ngoại nhiễm sắc thể đều có thể được sử dụng.

Vector plasmid ngoại nhiễm sắc thể có thể bao gồm các plasmid nấm men bổ sung (YE_p), plasmid nấm men tái tạo (YR_p) và plasmid đoạn trung tâm nấm men (YC_p).

Ngoài ra, nhiễm sắc thể nấm men nhân tạo (YACs) còn có thể được sử dụng làm vector theo sáng chế.

Ví dụ cụ thể, các vector có sẵn có thể bao gồm pESCHIS, pESC-LEU, pESC-TRP, pESC-URA, pYES-DEST52 công nối, pAO815, pGAPZ A, pGAPZ B, pGAPZ C, pGAP α A, pGAP α B, pGAP α C, pPIC3.5K, pPIC6 A, pPIC6 B, pPIC6 C, pPIC6 α A, pPIC6 α B, pPIC6 α C, pPIC9K, pYC2/CT, vector hiển thị nấm men pYD1, pYES2, pYES2/CT, pYES2/NT A, pYES2/NT B, pYES2/NT C, pYES2/CT, pYES2.1, pYES-DEST52, pTEF1/Zeo, pFLD1, PichiaPinkTM, p427-TEF, p417-CYC, pGAL-MF, p427-TEF, p417-CYC, PTEF-MF, pBY011, pSGP47, pSGP46, pSGP36, pSGP40, ZM552, pAG303GAL-ccdB, pAG414GAL-ccdB, pAS404, pBridge, pGAD-GH, pGAD T7, pGBK T7, pHIS-2, pOBD2, pRS408, pRS410, pRS418, pRS420, pRS428, nấm men vi sinh dạng A, pRS403, pRS404, pRS405, pRS406, pYJ403, pYJ404, pYJ405, và pYJ406, mà sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Việc chèn polynucleotit vào nhiễm sắc thể có thể được thực hiện bằng bất kỳ phương pháp nào đã biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật, ví dụ, tái tổ hợp tương đồng, mà sáng chế không bị giới hạn ở đó. Chỉ dấu lựa chọn có thể còn được thêm vào để xác nhận sự chèn nhiễm sắc thể. Chỉ dấu lựa chọn được sử dụng để chọn các tế bào được biến đổi bằng vector, tức là, để xác định việc chèn phân tử axit nucleic mong muốn, và các ví dụ về chỉ dấu lựa chọn có thể bao gồm các chỉ dấu cung cấp các kiểu hình có thể lựa chọn, chẳng hạn như kháng thuốc, nhu cầu dinh dưỡng, kháng các tác nhân gây độc tế bào, hoặc biểu hiện trên bề mặt của polypeptit biến thể. Chỉ các tế bào biểu hiện chỉ dấu lựa chọn mới có thể sống sót hoặc biểu hiện các kiểu hình khác nhau trong môi

trường được xử lý bằng tác nhân chọn lọc, và do đó các tế bào đã biến đổi có thể được lựa chọn. Ví dụ, polynucleotit kiểu hoang dã có thể được thay thế bằng polynucleotit đột biến bằng cách sử dụng vector để chèn nhiễm sắc thể vào các tế bào.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “biến đổi” đề cập đến quy trình để chèn vector chứa polynucleotit mã hóa protein đích vào tế bào chủ để có thể biểu hiện protein đích trong tế bào chủ.

Polynucleotit được biến đổi có thể ở dạng được chèn vào nhiễm sắc thể của tế bào chủ hoặc ở dạng nằm ngoài nhiễm sắc thể miễn là protein được biểu hiện trong tế bào chủ. Ngoài ra, polynucleotit mã hóa protein đích có thể bao gồm ADN và ARN mã hóa protein đích. Polynucleotit mã hóa protein đích có thể được đưa vào tế bào chủ dưới bất kỳ hình thức nào miễn là polynucleotit được đưa vào tế bào chủ và protein được biểu hiện ở đó. Ví dụ, polynucleotit mã hóa protein đích có thể được đưa vào tế bào chủ dưới dạng catxet biểu hiện, là cấu trúc gen bao gồm tất cả các yếu tố thiết yếu cần thiết cho quá trình tự sao chép.

Catxet biểu hiện có thể thường bao gồm promotor được liên kết chức năng với polynucleotit mã hóa protein đích, tín hiệu kết thúc phiên mã, vị trí liên kết ribosom, và tín hiệu kết thúc dịch mã. Catxet biểu hiện có thể ở dạng vector biểu hiện tự sao chép. Ngoài ra, polynucleotit mã hóa protein đích có thể được đưa vào tế bào chủ ở dạng gốc ban đầu và được liên kết chức năng với trình tự cần thiết cho sự biểu hiện trong tế bào chủ, mà sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Ngoài ra, như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “liên kết chức năng” có nghĩa là trình tự polynucleotit mã hóa protein đích của sáng chế được liên kết chức năng với trình tự promotor để bắt đầu và làm trung gian dịch mã của trình tự polynucleotit.

Theo mục đích của sáng chế, promotor có thể là polynucleotit có hoạt tính promotor theo sáng chế.

Các phương pháp biến đổi theo sáng chế bao gồm bất kỳ phương pháp nào cho phép đưa vector vào tế bào chủ, và có thể được thực hiện bằng các kỹ thuật tiêu chuẩn thích hợp đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật được lựa chọn phù hợp với tế bào chủ. Ví dụ, điện di, kết tủa canxi phosphat (CaPO_4), kết tủa canxi clorua (CaCl_2), vi tiêm, phương pháp polyetylen glycol (PEG), phương pháp DEAE–dextran, phương pháp liposom cation, và phương pháp lithi axetat–MSO có thể được sử dụng, nhưng sáng chế

không bị giới hạn ở đó.

Theo khía cạnh khác của sáng chế đề xuất vi sinh vật chứa polynucleotit có hoạt tính promotor theo sáng chế, polynucleotit chứa polynucleotit được mô tả ở trên, và gen mã hóa protein đích, hoặc vector chứa polynucleotit.

Protein đích có thể là polypeptit có hoạt tính glutamat–xystein ligaza. Polynucleotit có hoạt tính promotor theo sáng chế, protein đích, polypeptit có hoạt tính glutamat–xystein ligaza, và vector như được mô tả ở trên.

Vi sinh vật có thể là nấm men, cụ thể là vi sinh vật thuộc chi *Saccharomyces* sp., và cụ thể hơn là *Saccharomyces cerevisiae*.

Vi sinh vật có thể là vi sinh vật biểu hiện glutamat–xystein ligaza, vi sinh vật biểu hiện polypeptit có hoạt tính glutamat–xystein ligaza, hoặc vi sinh vật trong đó polypeptit có hoạt tính glutamat–xystein ligaza được đưa vào, mà sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Theo phương án của sáng chế, vi sinh vật có thể là vi sinh vật có khả năng sản sinh glutathion, vi sinh vật được điều chế bằng cách tăng cường khả năng sản sinh glutathion ở dòng bố mẹ có khả năng sản sinh glutathion thấp một cách tự nhiên, hoặc vi sinh vật được điều chế bằng cách tạo khả năng sản sinh glutathion cho dòng bố mẹ không thể sản sinh glutathion. Theo phương án của sáng chế, vi sinh vật có thể là vi sinh vật biểu hiện biến thể glutamat–xystein ligaza bao gồm ít nhất một biến đổi axit amin trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 33, và sự biến đổi axit amin có thể bao gồm sự thay thế axit amin thứ 86 từ đầu tận cùng N có mã nhận biết SEQ ID NO: 33 bằng axit amin khác. Tuy nhiên, sáng chế không bị giới hạn ở đó. Biến thể glutamat–xystein ligaza như được mô tả ở trên.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ protein “được biểu hiện/đã biểu hiện” có nghĩa là trạng thái trong đó protein đích, ví dụ, glutamat–xystein ligaza hoặc biến thể của nó, được đưa vào hoặc sửa đổi để được biểu hiện trong vi sinh vật. Trong trường hợp khi protein có mặt trong vi sinh vật, hoạt tính của protein được tăng cường so với hoạt tính của protein nội sinh của nó hoặc trước khi sửa đổi.

Cụ thể, thuật ngữ “đưa vào protein” đề cập đến việc cung cấp hoạt tính của protein cụ thể cho vi sinh vật không sở hữu protein hoặc tăng cường hoạt tính của protein so với hoạt tính nội tại của protein hoặc hoạt tính trước khi sửa đổi. Ví dụ, việc đưa vào protein

có thể đề cập đến việc đưa polynucleotit mã hóa protein vào nhiễm sắc thể hoặc đưa vectơ chứa polynucleotit mã hóa protein cụ thể vào vi sinh vật để từ đó biểu hiện hoạt tính của protein.

Ngoài ra, “tăng cường hoạt tính” có thể có nghĩa là hoạt tính của protein cụ thể của vi sinh vật được tăng cường khi so sánh với hoạt tính nội tại hoặc hoạt tính trước khi sửa đổi. Thuật ngữ “hoạt tính nội tại” có thể đề cập đến hoạt tính của protein cụ thể được sở hữu bởi dòng bố mẹ trước khi biến đổi khi vi sinh vật được biến đổi bởi biến đổi gen tự nhiên hoặc nhân tạo.

Theo mục đích của sáng chế, việc tăng cường hoạt tính có thể đạt được bằng cách sử dụng trình tự polynucleotit có hoạt tính promoter theo sáng chế làm trình tự điều hòa biểu hiện của protein đích. Protein đích có thể là kiểu hoang dã hoặc biến thể như mô tả ở trên, trình tự điều hòa biểu hiện có thể là trình tự điều hòa biểu hiện của gen mã hóa biến thể protein hoặc trình tự điều hòa biểu hiện của gen nhiễm sắc thể mã hóa protein kiểu hoang dã.

Ngoài ra, bất kỳ phương pháp nào khác để tăng cường hoạt tính hoặc phương pháp kết hợp có thể được sử dụng. Ví dụ, ngoài phương pháp sử dụng trình tự polynucleotit có hoạt tính promoter theo sáng chế làm trình tự điều hòa biểu hiện của protein đích, ít nhất một phương pháp được chọn từ nhóm bao gồm phương pháp tăng số lượng bản sao của gen mã hóa protein đích trong tế bào, phương pháp thay thế gen nhiễm sắc thể mã hóa protein kiểu hoang dã bằng gen mã hóa biến thể protein, phương pháp đưa thêm đột biến vào gen mã hóa protein để tăng cường hoạt tính của biến thể protein, và có thể sử dụng phương pháp đưa biến thể protein vào vi sinh vật, mà sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Hoạt tính của protein đích có thể được tăng cường bằng cách sử dụng polynucleotit có hoạt tính promoter theo sáng chế làm trình tự điều hòa biểu hiện của protein đích trong vi sinh vật.

Ví dụ, hoạt tính hoặc nồng độ của protein thường có thể tăng lên tối thiểu 1%, 10%, 25%, 50%, 75%, 100%, 150%, 200%, 300%, 400% , hoặc 500% đến tối đa 1000% hoặc 2000%, so với hoạt tính hoặc nồng độ của chủng vi sinh vật kiểu hoang dã hoặc không sửa đổi, mà sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “vi sinh vật không sửa đổi” không loại trừ các

chúng có đột biến có thể xảy ra tự nhiên ở vi sinh vật, và có thể là chủng kiểu hoang dã, vi sinh vật không chứa polynucleotit có hoạt tính promotor theo sáng chế, hoặc vi sinh vật không được biến đổi với vector chứa polynucleotit có hoạt tính promotor theo sáng chế.

Vi sinh vật theo sáng chế có thể là vi sinh vật sản sinh glutathion.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “glutathion” có thể được sử dụng thay thế với “GSH” và đề cập đến hợp chất tripeptit gồm có 3 axit amin: glutamat, xystein, và glyxin. Glutathion có thể được sử dụng làm nguyên liệu thô cho dược phẩm, thực phẩm chức năng cho sức khỏe, thành phần hương vị, phụ gia thực phẩm và thức ăn chăn nuôi, mỹ phẩm, và những loại tương tự, nhưng không bị giới hạn ở đó.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “vi sinh vật sản sinh glutathion” bao gồm các vi sinh vật trong đó việc sửa đổi gen tự nhiên hoặc nhân tạo xảy ra, và có thể đề cập đến vi sinh vật có cơ chế cụ thể bị suy yếu hoặc tăng cường thông qua việc đưa vào gen ngoại sinh hoặc tăng cường hoặc bất hoạt gen nội sinh bằng cách sửa đổi gen để tạo ra glutathion. Theo mục đích của sáng chế, vi sinh vật sản sinh glutathion có thể đề cập đến vi sinh vật chứa polynucleotit có hoạt tính promotor theo sáng chế và có khả năng sản sinh lượng lớn glutathion mục tiêu so với vi sinh vật kiểu hoang dã hoặc không sửa đổi.

“Vi sinh vật sản sinh glutathion” có thể được sử dụng thay thế với “vi sinh vật sản sinh glutathion”, “vi sinh vật có khả năng sản sinh glutathion”, “chủng sản sinh glutathion”, “chủng có khả năng sản sinh glutathion”, hoặc các thuật ngữ tương tự.

Vi sinh vật sản sinh glutathion có thể là vi sinh vật tái tổ hợp. Vi sinh vật tái tổ hợp được mô tả ở trên. Vi sinh vật có thể bao gồm đột biến để tăng cường con đường sinh tổng hợp để tăng khả năng sản sinh glutathion, giải phóng ức chế phản hồi, hoặc bất hoạt các gen làm suy yếu con đường thoái hóa hoặc con đường sinh tổng hợp, và đột biến như vậy có thể do phương pháp nhân tạo, ví dụ, chiếu xạ cực tím, và không loại trừ đột biến xảy ra tự nhiên.

Theo khía cạnh khác của sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất glutathion, phương pháp này bao gồm nuôi cấy vi sinh vật trong môi trường nuôi cấy. Vi sinh vật và glutathion được mô tả ở trên. Glutathion có thể được tích lũy trong vi sinh vật bằng cách nuôi cấy chúng.

Đối với môi trường nuôi cấy được sử dụng để nuôi cấy chủng theo sáng chế hoặc các điều kiện nuôi cấy khác, bất kỳ môi trường nuôi cấy nào thường được sử dụng để nuôi cấy vi sinh vật thuộc chi *Saccharomyces* đều có thể được sử dụng mà không bị giới hạn, và cụ thể, chủng này theo sáng chế có thể được nuôi cấy trong môi trường thông thường có chứa các nguồn cacbon, nguồn nitơ, nguồn phospho, các hợp chất vô cơ, các axit amin, và/hoặc vitamin thích hợp trong điều kiện hiếu khí hoặc kỵ khí trong khi điều chỉnh nhiệt độ, độ pH, và những thứ tương tự.

Theo sáng chế, đối với nguồn cacbon, các carbohydrat như glucoza, fructoza, sucroza, và maltoza; rượu đường như manitol và sorbitol; axit hữu cơ như axit pyruvic, axit lactic, và axit xitric; và các axit amin như glutamat, metionin, và lysin có thể được sử dụng, mà sáng chế không bị giới hạn ở đó. Ngoài ra, các chất dinh dưỡng hữu cơ tự nhiên như sản phẩm thủy phân tinh bột, mật đường, mật mía đen, cám gạo, sắn, bã mía và dịch chiết ngô có thể được sử dụng, và các carbohydrat như glucoza và mật đường đã được xử lý trước vô trùng (tức là, mật đường được chuyển hóa thành đường khử) có thể được sử dụng, và các lượng thích hợp của bất kỳ nguồn cacbon nào khác cũng có thể được sử dụng không giới hạn. Các nguồn cacbon này có thể được sử dụng một mình hoặc kết hợp với ít nhất hai nguồn cacbon.

Đối với nguồn nitơ, các nguồn nitơ vô cơ như amoniac, amoni sulfat, amoni clorua, amoni axetat, amoni phosphat, amoni carbonat, và amoni nitrat; và các nguồn nitơ hữu cơ như axit amin, pepton, NZ-amin, chiết xuất thịt, chiết xuất men, chiết xuất mạch nha, rượu ngô, thủy phân casein, cá hoặc các sản phẩm phân hủy của chúng, và bánh đậu nành đã khử chất béo hoặc các sản phẩm phân hủy của chúng có thể được sử dụng. Những nguồn nitơ này có thể được sử dụng một mình hoặc kết hợp với ít nhất hai trong số các nguồn nitơ này.

Đối với các nguồn phospho, monokali phosphat, đikali phosphat, hoặc các muối chứa natri tương ứng với chúng có thể được sử dụng. Đối với các hợp chất vô cơ, natri clorua, canxi clorua, sắt clorua, magie sulfat, sắt sulfat, mangan sulfat, canxi carbonat, và những chất tương tự có thể được sử dụng.

Môi trường nuôi cấy còn có thể bao gồm các axit amin, vitamin và/hoặc các tiền chất phù hợp. Cụ thể, axit amin L hoặc tương tự có thể được thêm vào môi trường nuôi cấy chủng. Cụ thể, có thể thêm glyxin, glutamat và/hoặc xystein vào môi trường nuôi

cây, và các axit amin L như lysin còn có thể được thêm vào đó, nếu cần, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Môi trường nuôi cấy và các tiền chất có thể được bổ sung vào các quá trình nuôi cấy theo mẻ hoặc liên tục, mà sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Theo sáng chế, trong quá trình nuôi cấy chủng, các hợp chất như amoni hydroxit, kali hydroxit, amoniac, axit phosphoric và axit sulfuric có thể được thêm vào môi trường nuôi cấy một cách thích hợp để điều chỉnh độ pH của môi trường nuôi cấy. Ngoài ra, có thể thêm chất khử bọt như este polyglycol của axit béo để hạn chế tạo bọt trong quá trình nuôi cấy. Ngoài ra, oxy hoặc khí chứa oxy có thể được bơm vào môi trường nuôi cấy để giữ cho môi trường nuôi cấy trong điều kiện hiếu khí, và khí nitơ, hydro, hoặc cacbon đioxit có thể được bơm vào các mẫu nuôi cấy để giữ cho quá trình nuôi cấy trong điều kiện kỵ khí và vi hiếu khí mà không cần bơm bất kỳ loại khí nào khác vào đó.

Nhiệt độ của các mẫu nuôi cấy có thể được duy trì ở 25°C đến 40°C, cụ thể hơn là ở 28°C đến 37°C, mà sáng chế không bị giới hạn ở đó. Việc nuôi cấy có thể được tiếp tục cho đến khi thu được lượng sản phẩm mong muốn, cụ thể là trong 1 giờ đến 100 giờ, mà sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Phương pháp sản xuất glutathion có thể còn bao gồm quy trình bổ sung sau bước nuôi cấy. Quy trình bổ sung có thể được lựa chọn phù hợp theo mục đích sử dụng glutathion.

Cụ thể, phương pháp sản xuất glutathion có thể còn bao gồm thu hồi glutathion được lựa chọn từ ít nhất một trong số vi sinh vật được nuôi cấy, sản phẩm sấy khô của vi sinh vật, chiết xuất của vi sinh vật, sản phẩm nuôi cấy của vi sinh vật, và chất ly giải của vi sinh vật, sau bước nuôi cấy.

Phương pháp có thể còn bao gồm ly giải vi sinh vật (chủng) trước hoặc đồng thời với bước thu hồi. Việc ly giải chủng có thể được thực hiện bằng bất kỳ phương pháp nào thường được sử dụng trong lĩnh vực kỹ thuật mà sáng chế đề cập đến, ví dụ, bằng cách xử lý nhiệt hoặc bằng cách sử dụng dung dịch đệm để ly giải, máy phá mẫu bằng sóng siêu âm và máy ép kiểu Pháp. Ngoài ra, bước ly giải có thể bao gồm phản ứng enzym bởi enzym lytic của thành tế bào, nucleaza, transnucleotidaza, proteaza, hoặc tương tự, mà sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Theo mục đích của sáng chế, theo phương pháp sản xuất glutathion, nấm men khô, chiết xuất nấm men, và bột hỗn hợp chiết xuất nấm men, mỗi loại có hàm lượng glutathion cao, và glutathion tinh khiết có thể được điều chế. Tuy nhiên, sáng chế không bị giới hạn ở đó, và những sản phẩm này có thể được điều chế thích hợp theo sản phẩm mong muốn.

Theo sáng chế, nấm men khô có thể được sử dụng thay thế với “sản phẩm sấy khô của vi sinh vật”, “sản phẩm sấy khô của chủng”, hoặc các sản phẩm tương tự. Nấm men khô có thể được điều chế bằng cách sấy khô chủng men trong đó glutathion được tích lũy, và cụ thể, nó có thể được chứa trong chế phẩm thức ăn chăn nuôi, chế phẩm thực phẩm, và những loại tương tự, mà sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Theo sáng chế, chiết xuất nấm men có thể được sử dụng thay thế với các thuật ngữ như “chiết xuất của vi sinh vật”, “chiết xuất chủng”, hoặc tương tự. Chiết xuất chủng có thể đề cập đến các chất còn lại sau khi tách thành tế bào ra khỏi chủng. Cụ thể, chiết xuất chủng có thể đề cập đến các thành phần còn lại sau khi loại bỏ thành tế bào khỏi các thành phần thu được bằng cách ly giải tế bào. Chiết xuất chủng bao gồm glutathion và một hoặc nhiều thành phần khác được lựa chọn từ protein, carbohydrat, axit nucleic, và các sợi ngoài glutathion, mà sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Bước thu hồi có thể được thực hiện bằng cách sử dụng bất kỳ phương pháp phù hợp nào đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật, và glutathion là chất đích có thể được thu hồi.

Bước thu hồi có thể bao gồm quy trình tinh chế. Quy trình tinh chế có thể được thực hiện bằng cách tách glutathion khỏi chủng. Thông qua quá trình tinh chế, glutathion tinh khiết có thể được điều chế.

Nếu cần, phương pháp điều chế glutathion có thể còn bao gồm trộn tá dược với một trong số được lựa chọn từ chủng, sản phẩm sấy khô, chất chiết xuất, sản phẩm nuôi cấy, và ly giải của chúng, và glutathion được thu hồi từ đó. Bằng bước trộn, bột hỗn hợp chiết xuất nấm men có thể được điều chế.

Tá dược có thể được lựa chọn thích hợp và sử dụng theo cách sử dụng hoặc dạng định trước, và có thể là, ví dụ, được chọn từ tinh bột, glucoza, xenluloza, lactoza, glycogen, D-manitol, sorbitol, lactitol, maltodextrin, canxi carbonat, nhôm silicat tổng hợp, canxi monohydro phosphat, canxi sulfat, natri clorua, natri hydro carbonat, lanolin tinh khiết, dextrin, natri alginat, metyl xenluloza, gel silic dạng keo, tinh bột

hydroxypropyl, hydroxypropylmetyl xenluloza, propylen glycol, casein, canxi lactat, primojel, và gôm Arabic, và cụ thể, nó có thể bao gồm ít nhất một thành phần được chọn từ tinh bột, glucoza, xenluloza, lactoza, đextrin, glycogen, D-manitol và maltodextrin, mà sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Tá được có thể bao gồm, ví dụ, chất bảo quản, chất giữ ẩm, chất phân tán, chất tạo huyền phù, chất đệm, chất ổn định hoặc chất đẳng trương, mà sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Theo khía cạnh khác của sáng chế đề xuất việc sử dụng polynucleotit, trong đó ít nhất một nucleotit được chọn từ các nhóm gồm các nucleotit thứ 92, 94, 102, 103, 249, và 251 của trình tự polynucleotit có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2 được thay thế bằng nucleotit khác, làm promotor.

Polynucleotit được mô tả ở trên.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết có tham chiếu đến các ví dụ và các ví dụ thử nghiệm bên dưới. Tuy nhiên, các ví dụ và các ví dụ thử nghiệm bên dưới chỉ được đưa ra để làm ví dụ minh họa cho sáng chế, và phạm vi bảo hộ của sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Ví dụ 1: Thu được chủng CJ-5 có khả năng sản sinh glutathion

Các chủng thu được từ các khối nấm men có chứa các chủng khác nhau, và đặc tính của chúng được cải thiện để chọn ra chủng có khả năng sản sinh glutathion.

Cụ thể, các mẫu ngũ cốc như gạo, lúa mạch, đậu xanh và yến mạch được thu thập từ 20 khu vực, chẳng hạn như Hwaseong, Pyeongtaek, Yongin, và những nơi tương tự ở Gyeonggi-do, Hàn Quốc, sau đó được nghiền thành bột, nhào, gói bằng vải, ép chặt tạo hình, bọc rom ủ men trong 10 ngày, sấy khô từ từ để tạo khối nấm men.

Thử nghiệm sau đây được thực hiện để phân lập các chủng khác nhau khỏi các khối nấm men được điều chế. 45 ml dung dịch muối được thêm vào 5 g khối nấm men và nghiền thành bột bằng máy trộn. Để phân lập thuần khiết chủng nấm men, bột thu được được pha loãng bằng cách pha loãng nối tiếp, trải trên thạch YPD (10 g/l chiết xuất nấm men, 20 g/l Bacto pepton, và 20 g/l glucoza trên 1 l nước cất), và được nuôi cấy ở 30°C trong 48 giờ. Sau đó, dựa trên hình thái của khuẩn lạc và xác minh bằng kính hiển

vi, các khuẩn lạc của nấm men được xếp thành vệt trên thạch YPD. 25 ml môi trường YPD được cấy vào bình tam giác 250 ml, và chủng đã phân lập thuần khiết được cấy chủng vào đó và được nuôi cấy trong tủ ấm lắc trong 48 giờ ở 30°C và 200 vòng/phút. Các chủng được sàng lọc bằng cách xác định việc sản sinh glutathion.

Để tăng cường các chủng chủ yếu được phân lập, đột biến ngẫu nhiên đã được gây ra trong các chủng được phân lập. Cụ thể, chủng được xác nhận là có khả năng sản sinh glutathion đã được phân lập từ các khối nấm men và được đặt tên là chủng CJ-37. Chủng CJ-37 được nuôi cấy trong môi trường rắn và được cấy chủng vào môi trường nuôi cấy để thu được dung dịch nuôi cấy của nó, và dung dịch nuôi cấy được chiếu tia cực tím bằng đèn cực tím. Sau khi dung dịch nuôi cấy đã chiếu tia cực tím được cấy chuyển trên môi trường đĩa, chỉ có chủng đột biến đã hình thành khuẩn lạc được phân lập, và việc sản sinh glutathion của chúng được xác định.

Kết quả là, trong số các chủng đột biến, chủng thể hiện khả năng sản sinh lượng glutathion lớn nhất được lựa chọn làm chủng sản sinh glutathion và được đặt tên là chủng CJ-5 và được nộp lưu chủng theo Hiệp ước Budapest vào Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc (Korean Culture Center of Microorganisms: KCCM) với số lưu chủng KCCM12568P vào ngày 31/07/2019.

Ví dụ 2: Phát triển trình tự đã sửa đổi của GSH1 bằng thử nghiệm để tăng cường thêm cho chủng CJ-5

Ví dụ 2-1: Gây ra đột biến và xác định trình tự đã sửa đổi

Đột biến được gây ra theo cách thức sau để cải thiện hơn nữa khả năng sản sinh glutathion của chủng CJ-5

Chủng CJ-5 được nuôi cấy trong môi trường rắn và cấy chủng vào môi trường nuôi cấy để thu được dung dịch nuôi cấy, và dung dịch nuôi cấy được chiếu tia cực tím bằng đèn cực tím. Sau khi dung dịch nuôi cấy đã chiếu tia cực tím được cấy chuyển trên môi trường đĩa, chỉ dòng đột biến đã hình thành khuẩn lạc được phân lập. Chủng thể hiện khả năng sản sinh glutathion lớn nhất được phân lập và đặt tên là chủng CC02-2490 và được nộp lưu chủng theo Hiệp ước Budapest vào Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc (Korean Culture Center of Microorganisms: KCCM) với số lưu chủng KCCM12659P vào ngày 17/01/2020. Kết quả của việc phân tích trình tự bazơ của gen sinh tổng hợp glutathion, GSH1, liên quan đến việc tăng cường khả năng sản sinh

glutathion của chủng, khẳng định rằng xystein là axit amin thứ 86 của protein GSH1 được mã hóa bởi gen GSH1 đã được thay thế bằng arginin.

Ví dụ 2-2: Thử nghiệm sự thay thế gốc C86 của protein GSH1

Xét rằng axit amin ở vị trí thứ 86 của protein GSH1 có vai trò quan trọng trong sản sinh glutathion dựa trên các kết quả của ví dụ 2-1, các chủng đột biến của *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) CEN.PK2-1D và chủng CJ-5 *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) được điều chế để biểu hiện các biến thể protein trong đó xystein ở vị trí thứ 86 của protein GSH1 được thay thế bằng axit amin khác, và sự gia tăng sản sinh glutathion đã được xác định.

Để điều chế các chủng trong đó xystein ở vị trí thứ 86 của protein GSH1 của *Saccharomyces cerevisiae* được thay thế bằng arginin, các plasmid pWAL100 và pWBR100 đã được sử dụng có tham chiếu đến công bố của Lee TH, *et al.* (*J. Microbiol. Biotechnol.* (2006), 16 (6), 979–982). Cụ thể, phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) được thực hiện như sau bằng cách sử dụng ADN bộ gen của chủng CJ-5 làm mạch khuôn. Trình tự một phần của đầu tận cùng N của protein GSH1 bao gồm trình tự kế cận BamHI đầu tận cùng N, codon khởi đầu GSH1 ORF, và trình tự mã hóa đột biến C86R thu được bằng cách thực hiện PCR sử dụng cặp mồi có mã nhận biết SEQ ID NO: 34 và SEQ ID NO: 35, và trình tự một phần của đầu tận cùng C của protein GSH1 bao gồm trình tự kế cận XhoI đầu C, codon kết thúc ORF GSH1 và trình tự mã hóa đột biến C86R thu được bằng cách thực hiện PCR sử dụng cặp mồi có mã nhận biết SEQ ID NO: 36 và SEQ ID NO: 37. Sau đó, do kết quả thực hiện PCR chồng lắp bằng cách sử dụng hai trình tự làm mạch khuôn với cặp mồi có mã nhận biết SEQ ID NO: 34 và SEQ ID NO: 37, phân đoạn ORF GSH1, bao gồm trình tự mã hóa biến thể GSH1 trong đó xystein ở vị trí thứ 86 được thay thế bằng arginin và các trình tự enzym giới hạn BamHI đầu N và XhoI đầu C thu được. Phân đoạn ORF được xử lý bằng BamHI và XhoI và sau đó được nhân bản thành vector pWAL100 được xử lý bằng các enzym tương tự để điều chế vector pWAL100-GSH1 (C86R).

Ngoài ra, 500 bp phía sau từ codon kết thúc ORF GSH1 bao gồm các trình tự enzym giới hạn SpeI đầu N và NcoI đầu C thu được bằng cách thực hiện PCR sử dụng ADN bộ gen của chủng CJ-5 làm mạch khuôn và cặp mồi có mã nhận biết SEQ ID NO: 38 và SEQ ID NO: 39 và được xử lý bằng các enzym giới hạn SpeI và NcoI. Sau đó,

sản phẩm thu được được nhân bản thành pWBR100 được xử lý bằng các enzym tương tự để điều chế vector pWBR100-GSH1.

Trước khi điều chế phân đoạn ADN cuối cùng để đưa vào nấm men, các sản phẩm PCR bao gồm đột biến arginin mã hóa trình tự và một phần KIURA3 đã thu được bằng cách sử dụng vector pWAL100-GSH1 (C86R) được điều chế như mô tả ở trên làm mạch khuôn và cặp môi có mã nhận biết SEQ ID NO: 34 và SEQ ID NO: 40, và các sản phẩm PCR bao gồm phần KIURA3 và 500 bp phía sau từ codon kết thúc GSH1 thu được bằng cách sử dụng vector pWBR100-GSH1 làm mạch khuôn và cặp môi có mã nhận biết SEQ ID NO: 41 và SEQ ID NO: 39. *S. cerevisiae* CEN.PK2-1D và *S. cerevisiae* CJ-5 được biến đổi với các sản phẩm PCR theo cùng tỷ lệ mol. PCR được thực hiện thông qua biến tính ở 95°C trong 5 phút, ủ ở 53°C trong 1 phút, và trùng hợp trong 1 phút cho mỗi kg ở 72°C, và quá trình biến đổi men được thực hiện theo phương pháp lithi axetat đã được sửa đổi từ phương pháp được bộc lộ trong ấn phẩm của Geitz (*Nucleic Acid Research*, 20(6), 1425). Cụ thể, các tế bào nấm men có O.D. từ 0,7 đến 1,2 được rửa bằng dung dịch đệm lithi axetat/TE hai lần và trộn với các sản phẩm PCR và ADN sợi đơn (Sigma D-7656). Hỗn hợp này được nuôi cấy trong điều kiện nuôi cấy tĩnh trong dung dịch đệm lithi axetat/TE/40% PEG ở 30°C trong 30 phút và ở 42°C trong 15 phút. Sau đó, các tế bào được nuôi cấy trong đĩa thạch SC (2% glucoza) không bao gồm uraxil cho đến khi các khuẩn lạc có thể nhìn thấy được để thu được chủng mà trình tự mã hóa đột biến C86R GSH1 và gen KIURA3 được đưa vào. Sau đó, để loại bỏ KIURA3, các chủng được nuôi cấy trong 2 ml YPD qua đêm, pha loãng với tỷ lệ 1/100, được cấy chuyển trên đĩa thạch SC (2% glucoza) bao gồm 0,1% 5-FOA để điều chế chủng đột biến *S. cerevisiae* CEN.PK2-1D GSH1 C86R và chủng đột biến *S. cerevisiae* CJ-5 GSH1 C86R mà từ đó chỉ dấu uraxil đã bị loại bỏ. Các chủng có khả năng biểu hiện các biến thể GSH1 trong đó xystein được thay thế bằng 18 loại axit amin ngoài arginin cũng được điều chế theo cách tương tự, ngoại trừ cặp môi có mã nhận biết SEQ ID NO: 35 và SEQ ID NO: 36 trong đó trình tự mã hóa arginin thứ 86 đã được thay thế bằng trình tự mã hóa axit amin khác.

Bảng 1

Đoạn môi	Trình tự 5' → 3'
F_BamHI_GSH1 (SEQ ID NO: 34)	GGTAGGATCCATGGGACTCTTAGCTTTGGGCAC

R_GSH1_C86R (SEQ ID NO: 35)	TTAGCCTCCCTAAGGGACGAATCCT
F_GSH1_C86R (SEQ ID NO: 36)	CGTCCCTTA AGGG AGGCTAACGATGT
R_XhoI_GSH1 (SEQ ID NO: 37)	ATGACTCGAGTTAACATTTGCTTTCTATTGAAGGC
F_SpeI_GSH1_DW (SEQ ID NO: 38)	TAGAACTAGTACTCCTTTTATTTTCGGTTGTGAA
R_NcoI_GSH1_DW (SEQ ID NO: 39)	GCTGCCATGGGAATAGTGTGAACCGATAACTGTGT
R_AL killer (SEQ ID NO: 40)	GAGCAATGAACCCAATAACGAAATCTT
F_BR killer (SEQ ID NO: 41)	CTTGACGTTTCGTTTCGACTGATGAG

Sau khi nuôi cấy các chủng được điều chế như mô tả ở trên trong 26 giờ, nồng độ của glutathion (GSH) đã sản sinh được đo và thể hiện trong Bảng 2 và 3.

Bảng 2

S.cerevisiae CEN.PK2-1D		
Đột biến	Nồng độ GSH (mg/L) 26 giờ	Tăng (lần)
Trong lượng	86,0	1,00
F	109,5	1,27
H	103,2	1,20
K	100,7	1,17
E	100,1	1,16
G	99,5	1,16
D	97,5	1,13
N	96,3	1,12
R	95,2	1,11
Y	94,6	1,10
I	93,0	1,08
L	92,2	1,07
P	92,0	1,07
W	90,8	1,06
Q	90,3	1,05
S	90,0	1,05
M	89,9	1,05
T	86,6	1,01
A	86,4	1,00
V	86,2	1,00

Bảng 3

S.cerevisiae CJ-5		
Đột biến	Nồng độ GSH (mg/L) 26 giờ	Tăng (lần)
Trọng lượng	271,3	1,00
R	330,0	1,22
N	321,9	1,19
D	318,4	1,17
E	314,4	1,16
P	304,2	1,12
K	302,4	1,11
A	294,9	1,09
Q	286,4	1,06
V	285,6	1,05
F	282,5	1,04
Y	277,5	1,02
W	276,0	1,02
S	274,5	1,01
T	273,9	1,01
I	273,5	1,01
H	272,1	1,00
G	272,0	1,00

Với kết quả của thử nghiệm, khẳng định rằng khả năng sản sinh glutathion thu được bằng cách thay thế xystein ở vị trí thứ 86 của protein GSH1 bằng axit amin khác đã tăng lên đến 27% so với khả năng sản sinh glutathion thu được bằng protein GSH1 kiểu hoang dã.

Ví dụ 2-3: Gây ra đột biến bổ sung để tăng cường khả năng sản sinh glutathion và xác định trình tự đã sửa đổi

Đột biến được gây ra theo cách sau để tăng cường hơn khả năng sản sinh glutathion của chủng CC02-2490.

Chủng CC02-2490 được nuôi cấy trong môi trường rắn và cấy chủng vào môi trường nuôi cấy để thu được dung dịch nuôi cấy, và dung dịch nuôi cấy được chiếu tia cực tím bằng đèn cực tím. Sau khi dung dịch nuôi cấy được chiếu ánh sáng cực tím được cấy chuyển trên môi trường đĩa, chỉ chủng đột biến đã hình thành khuẩn lạc được phân lập, và các trình tự của vùng mã hóa GS1 và vùng phía trước của chúng được phân tích

trong chủng có khả năng sản sinh glutathion được tăng cường nhất.

Kết quả là, khẳng định rằng việc biến đổi xảy ra ở các vị trí -250 (C→T), -252 (G→A), -398 (A→T), -399 (A→C), -407 (T→C), và -409 (T→C) phía trước từ trình tự ORF GSH1. Chủng được đặt tên là chủng CC02-2544 và được nộp lưu chủng theo Hiệp ước Budapest vào Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc (Korean Culture Center of Microorganisms: KCCM) với số lưu chủng KCCM12674P vào ngày 20/02/2020.

Ví dụ 2-4: Xác định khả năng sản sinh glutathion theo đột biến trong promotor GSH1

Để so sánh khả năng sản sinh glutathion với sự có mặt và không có mặt của đột biến trong promotor, khả năng sản sinh glutathion của chủng CC02-2490 được điều chế trong ví dụ 2-1 và của chủng CC02-2544 được điều chế trong ví dụ 2-3 được đo. Khả năng sản sinh glutathion của chủng CEN.PK1-D kiểu hoang dã và chủng CJ-5 được đo làm đối chứng và được thể hiện trong bảng 4 bên dưới.

Bảng 4

Chủng	#	10 giờ	26 giờ			32 giờ		
		OD ₆₀₀	OD ₆₀₀	GSH (mg/L)	Hàm lượng GSH (%)	OD ₆₀₀	GSH (mg/L)	Hàm lượng GSH (%)
CEN.PK1-D	1	37,2	51,4	84,4	0,8	50,6	96,1	0,9
	2	36,2	51,6	82,2	0,8	52,0	92,6	0,9
	Trung bình	36,7	51,5	83,3	0,8	51,3	94,4	0,9
CJ-5	1	30,2	47,8	266,4	2,7	56,8	267,1	2,3
	2	30,0	53,4	256,1	2,3	55,6	266,0	2,3
	Trung bình	30,1	50,6	261,2	2,5	56,2	266,5	2,3
CC02-2490	1	36,4	63,4	375,4	2,9	63,2	368,6	2,8
	2	37,4	64,8	379,8	2,8	61,6	379,2	3,0
	Trung bình	36,9	64,1	377,6	2,9	62,4	373,9	2,9
CC02-2544	1	37,8	66,2	477,7	3,5	64,4	482,0	3,6
	2	38,8	64,4	484,2	3,7	60,6	477,0	3,8
	Trung bình	38,3	65,3	481,0	3,6	66,6	479,5	3,7

Với kết quả của thử nghiệm, khẳng định rằng việc sản xuất glutathion bằng chủng CC02-2544 tăng đáng kể khoảng 508% so với việc sản xuất bằng chủng CEN.PK1-D kiểu hoang dã.

Ngoài ra, việc sản xuất glutathion bằng chủng CC02-2544 tăng 128% hoặc cao hơn so với chủng bố mẹ CC02-2490.

Kết quả là, khẳng định rằng đột biến của trình tự promotor của gen GSH1 có thể dẫn đến sự gia tăng sản xuất glutathion.

Ví dụ 3: Thử nghiệm đưa đột biến vào promotor GSH1 của chủng

Để xác định ảnh hưởng của đột biến trong promotor lên các chủng, đột biến promotor được gây ra trong ví dụ 2-3 đã được đưa vào chủng kiểu hoang dã, chủng CJ-5 và chủng CC02-2490 được điều chế trong ví dụ 2-1, và khả năng sản sinh glutathion của chúng đã được đánh giá.

Trước tiên, kết quả của việc thực hiện căn chỉnh trình tự để đưa đột biến vào và xác định trình tự phía trước ORF GSH1 (SEQ ID NO: 2) của chủng CJ-5, khẳng định rằng chủng CJ-5 có cùng trình tự promotor GSH1 như các chủng *Saccharomyces cerevisiae* CEN KSD-Yc, YJM1450, YJM1401 và YJM1307. Tuy nhiên, khi so sánh với trình tự phía trước ORF GSH1 (SEQ ID NO: 1) của chủng kiểu hoang dã (*Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK1-D), khẳng định rằng adenin đã được đưa vào ở vị trí thứ -74 của promotor của chủng CJ-5.

Dựa vào đó, trong trình tự phía trước ORF GSH1 của chủng *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK1-D, các vị trí tương ứng với các vị trí thứ -250, -252, -398, -399, -407, và -409 của trình tự phía trước ORF GSH1 của chủng CJ-5 được xác định là vị trí thứ -249, -251, -397, -398, -406, và -408 bằng cách căn chỉnh trình tự.

Sau đó, sáu kiểu đột biến mô tả ở trên được đưa vào vùng phía trước ORF GSH1 của mỗi chủng *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK1-D, CJ-5, và CC02-2490.

Cụ thể, để điều chế các chủng trong đó sáu kiểu đột biến mô tả ở trên được đưa vào vùng phía trước ORF GSH1, các plasmid pWAL100 và pWBR100 được sử dụng có tham chiếu đến tài liệu công bố của Lee TH, *et al.* (*J. Microbiol. Biotechnol.* (2006), 16(6), 979–982).

Sau khi tổng hợp gen của đoạn chứa vùng phía trước ORF GSH1 bao gồm sáu kiểu

đột biến và vùng ORF GSH1, PCR được thực hiện bằng cách sử dụng cặp mồi có mã nhận biết SEQ ID NO: 34 và SEQ ID NO: 37 để nhờ đó thu được phân đoạn của vùng phía trước ORF GSH1 bao gồm trình tự enzym giới hạn BamHI đầu N, trình tự enzym giới hạn XhoI đầu C, và sáu kiểu đột biến. Sau đó, pWAL100 và phân đoạn được xử lý bằng BamHI và XhoI, tiếp theo là thất để chuẩn bị plasmid.

Ngoài ra, 500 bp phía sau từ codon kết thúc ORF GSH1 bao gồm trình tự enzym giới hạn SpeI đầu N và NcoI đầu C thu được bằng cách thực hiện PCR sử dụng ADN bộ gen của chủng CJ-5 làm mạch khuôn và cặp mồi có mã nhận biết SEQ ID NO: 38 và SEQ ID NO: 39 và được xử lý bằng các enzym giới hạn SpeI và NcoI. Sau đó, kết quả thu được được chuyển sang pWBR100 đã được xử lý bằng các enzym tương tự để chuẩn bị plasmid.

Trước khi chuẩn bị đoạn ADN cuối để được đưa vào men, các sản phẩm PCR bao gồm trình tự chứa vùng phía trước ORF GSH1 gồm sáu kiểu đột biến, vùng ORF GSH1 và một phần KIURA3 thu được bằng cách sử dụng plasmid pWAL được điều chế như mô tả ở trên làm mạch khuôn và cặp mồi có mã nhận biết SEQ ID NO: 34 và SEQ ID NO: 40, và các sản phẩm PCR bao gồm một phần của KIURA3 và 500 bp phía sau từ codon kết thúc ORF GSH1 đã thu được bằng cách sử dụng plasmid pWBR làm mạch khuôn và cặp mồi có mã nhận biết SEQ ID NO: 41 và SEQ ID NO: 39. Các chủng *S. cerevisiae* CEN.PK2-1D và *S. cerevisiae* CJ-5 và CC02-02490 được biến đổi với các sản phẩm PCR theo cùng một tỷ lệ mol. PCR được thực hiện thông qua biến tính ở 95°C trong 5 phút, ủ ở 53°C trong 1 phút, và trùng hợp trong 1 phút cho mỗi kg ở 72°C, và quá trình biến đổi men được thực hiện theo phương pháp lithi axetat đã được sửa đổi từ phương pháp được bộc lộ trong ấn phẩm của Geitz (*Nucleic Acid Research*, 20(6), 1425). Cụ thể, các tế bào men có O.D. từ 0,7 đến 1,2 được rửa bằng dung dịch đệm lithi axetat/TE hai lần. ADN và ADN sợi đơn (Sigma D-7656) được trộn lẫn, và hỗn hợp được nuôi cấy trong điều kiện nuôi cấy tĩnh trong dung dịch đệm lithi axetat/TE/40% PEG ở 30°C trong 30 phút và ở 42°C trong 15 phút. Sau đó, các tế bào được nuôi cấy trong đĩa thạch SC (2% glucoza) không bao gồm uraxil cho đến khi nhìn thấy các khuẩn lạc để thu được các chủng trong đó sáu kiểu đột biến và gen KIURA3 được đưa vào vùng phía trước ORF GSH1. Sau đó, để loại bỏ KIURA3, các chủng được nuôi cấy trong 2 ml YPD qua đêm, pha loãng theo tỷ lệ 1/100, được cấy chuyển trên đĩa thạch SC (2% glucoza) bao gồm 0,1% 5-FOA để chuẩn bị các chủng đột biến có nguồn gốc từ

S.cerevisiae CEN.PK2-1D có sáu kiểu đột biến trong vùng phía trước ORF GSH1 và các chủng đột biến có nguồn gốc từ *S. cerevisiae* CJ-5 và CC02-2490 có sáu kiểu đột biến trong vùng phía trước ORF GSH1.

Sản xuất GSH của các chủng được thể hiện trong bảng 5 bên dưới.

Bảng 5

Vật chủ	Đột biến	#	10 giờ	26 giờ			32 giờ		
			OD ₆₀₀	OD ₆₀₀	GSH (mg/L)	Hàm lượng GSH (%)	OD ₆₀₀	GSH (mg/L)	Hàm lượng GSH (%)
CEN.PK 1-D	Đối chứng	1	37,2	51,4	84,4	0,8	50,6	96,1	0,9
		2	36,2	51,6	82,2	0,8	52,0	92,6	0,9
		Trung bình	36,7	51,5	83,3	0,8	51,3	94,4	0,9
	Promotor GSH1, đột biến tại 6 điểm	1	36,6	49,2	110,3	1,1	51,8	131,0	1,2
		2	36,4	52,0	114,6	1,1	52,8	135,6	1,2
		Trung bình	36,5	50,6	112,4	1,1	52,3	133,3	1,2
CJ-5	Đối chứng	1	30,2	47,8	266,4	2,7	56,8	267,1	2,3
		2	30,0	53,4	256,1	2,3	55,6	266,0	2,3
		Trung bình	30,1	50,6	261,2	2,5	56,2	266,5	2,3
	Promotor GSH1, đột biến tại 6 điểm	1	30,2	53,0	332,8	3,0	54,2	325,5	2,9
		2	29,2	54,2	360,9	3,2	58,8	354,6	2,9
		Trung bình	29,7	53,6	346,9	3,1	56,5	340,1	2,9
CC02-2490	Đối chứng	1	36,4	63,4	375,4	2,9	63,2	368,6	2,8
		2	37,4	64,8	379,8	2,8	61,6	379,2	3,0
		Trung bình	36,9	64,1	377,6	2,9	62,4	373,9	2,9
	Promotor GSH1, đột biến tại 6 điểm	1	36,5	65,8	468,9	3,4	63,1	472,6	3,6
		2	37,6	66,2	475,0	3,4	63,6	471,8	3,5
		Trung bình	37,1	66,0	472,0	3,4	63,35	472,2	3,6

Theo kết quả của thử nghiệm, khẳng định rằng sản xuất glutathion tăng lên đến 141% trong cùng chủng theo đột biến trong promotor.

Kết quả là, khẳng định rằng đột biến của trình tự promotor của gen GSH1 có thể dẫn đến sự gia tăng sản sinh glutathion.

Ví dụ 4: Thử nghiệm để đưa đột biến vào promo tơ GSH1 (1)

Dựa vào các kết quả được khẳng định trong các ví dụ nêu trên, thử nghiệm được thực hiện để xác định xem khả năng sản sinh glutathion có được tăng cường bằng cách đưa đột biến vào chỉ một vài vị trí hay không.

Cụ thể, đột biến được đưa vào hai điểm tại các vị trí thứ -250 và -252 phía trước từ ORF GSH1 (-250 (C→T) và -252 (G→A)) và 4 điểm tại các vị trí thứ -398, -399, -407, và -409 (-398 (A→T), -399 (A→C), -407 (T→C), và -409 (T→C)) trong các chủng CEN.PK1-D, CJ-5, và CC02-2490, tương ứng. (Trong trường hợp CEN.PK1-D, đột biến được đưa vào vị trí thứ -249, -251, -397, -398, -406, và -408 tương ứng của nó, sẽ được áp dụng vào phần mô tả sau). Các chủng được điều chế theo cùng cách thức như ví dụ 3, ngoại trừ gen của phân đoạn chứa vùng phía trước ORF GSH1 bao gồm đột biến ở hai điểm hoặc bốn điểm và vùng ORF GSH1 được tổng hợp, và sau đó PCR được thực hiện bằng cách sử dụng các đoạn mồi có mã nhận biết để nhờ đó thu được đoạn của vùng phía trước ORF GSH1 chứa trình tự enzym giới hạn BamHI đầu N, trình tự enzym giới hạn XhoI đầu C, và đột biến ở hai điểm hoặc bốn điểm.

Kết quả của thử nghiệm được thể hiện trong các bảng từ 6 đến 8

Bảng 6

Vật chủ	Đột biến	#	10 giờ	26 giờ			32 giờ		
			OD ₆₀₀	OD ₆₀₀	GSH (mg/L)	Hàm lượng GSH (%)	OD ₆₀₀	GSH (mg/L)	Hàm lượng GSH (%)
CEN.PK 1-D	Đối chứng	1	37,2	51,4	84,4	0,8	50,6	96,1	0,9
		2	36,2	51,6	82,2	0,8	52,0	92,6	0,9
		Trung bình	36,7	51,5	83,3	0,8	51,3	94,4	0,9
	Promotơ GSH1, đột biến tại 2 điểm	1	37,2	50,6	109,8	1,1	53,6	132,0	1,2
		2	38,8	48,0	106,9	1,1	54,8	122,0	1,1
		Trung bình	38,0	49,3	108,3	1,1	54,2	127,0	1,1
	Promotơ GSH1, đột biến tại 4 điểm	1	37,2	51,4	100,6	0,9	54,2	105,3	0,9
		2	37,0	50,8	102,1	1,0	53,2	105,4	1,0
		Trung bình	37,1	51,1	101,3	1,0	53,7	105,3	1,0
	Promotơ GSH1,	1	36,6	49,2	110,3	1,1	51,8	131,0	1,2

	đột biến tại 6 điểm	2	36,4	52,0	114,6	1,1	52,8	135,6	1,2
		Trung bình	36,5	50,6	112,4	1,1	52,3	133,3	1,2

Bảng 7

Chủng	Đột biến	#	10 giờ	26 giờ			32 giờ		
			OD ₆₀₀	OD ₆₀₀	GSH (mg/L)	Hàm lượng GSH (%)	OD ₆₀₀	GSH (mg/L)	Hàm lượng GSH (%)
CJ-5	Đối chứng	1	30,2	47,8	266,4	2,7	56,8	267,1	2,3
		2	30,0	53,4	256,1	2,3	55,6	266,0	2,3
		Trung bình	30,1	50,6	261,2	2,5	56,2	266,5	2,3
	Promotor GSH1, đột biến tại 2 điểm	1	30,2	53,8	297,6	2,7	54,4	298,8	2,7
		2	30,4	57,6	299,0	2,5	53,0	292,4	2,7
		Trung bình	30,3	55,7	298,3	2,6	53,7	295,6	2,7
	Promotor GSH1, đột biến tại 4 điểm	1	31,2	52,4	328,8	3,0	57,2	326,6	2,8
		2	40,6	57,8	345,8	2,9	66,0	344,9	2,5
		Trung bình	35,9	55,1	337,3	3,0	61,6	335,7	2,7
	Promotor GSH1, đột biến tại 6 điểm	1	30,2	53,0	332,8	3,0	54,2	325,5	2,9
		2	29,2	54,2	360,9	3,2	58,8	354,6	2,9
		Trung bình	29,7	53,6	346,9	3,1	56,5	340,1	2,9

Bảng 8

Vật chủ	Đột biến	#	10 giờ	26 giờ			32 giờ		
			OD ₆₀₀	OD ₆₀₀	GSH (mg/L)	Hàm lượng GSH (%)	OD ₆₀₀	GSH (mg/L)	Hàm lượng GSH (%)
CC02-2490	Đối chứng	1	36,4	63,4	375,4	2,9	63,2	368,6	2,8
		2	37,4	64,8	379,8	2,8	61,6	379,2	3,0
		Trung bình	36,9	64,1	377,6	2,9	62,4	373,9	2,9
	Promotor GSH1, đột biến tại 2 điểm	1	37,0	64,8	415,0	3,1	66,6	419,5	3,1
		2	37,6	65,4	452,4	3,4	64,6	445,7	3,3
		Trung bình	37,3	65,1	433,7	3,2	65,6	432,6	3,2
	Promotor GSH1,	1	37,8	65,4	455,4	3,4	59,6	452,1	3,7

	đột biến tại 4 điểm	2	37,6	65,8	459,8	3,4	63,4	455,1	3,5
		Trung bình	37,7	65,6	457,6	3,4	66,6	453,6	3,6
	Promotor GSH1, đột biến tại 6 điểm	1	36,5	65,8	468,9	3,4	63,1	472,6	3,6
		2	37,6	66,2	475,0	3,4	63,6	471,8	3,5
		Trung bình	37,1	66,0	472,0	3,4	63,35	472,2	3,6

Theo kết quả của thử nghiệm, khẳng định rằng khả năng sản sinh glutathion được tăng cường bằng cách đưa đột biến vào hai điểm ($-250 (C \rightarrow T)$ và $-252 (G \rightarrow A)$) hoặc tại bốn điểm ($-398 (A \rightarrow T)$, $-399 (A \rightarrow C)$, $-407 (T \rightarrow C)$, và $-409 (T \rightarrow C)$) khi so sánh với các chủng không có đột biến ở vùng promotor, và sản xuất glutathion tăng lên tới 135%.

Dựa vào đó, khẳng định rằng khả năng sản sinh glutathion được tăng cường đáng kể nhờ đột biến được đưa vào chỉ một số vị trí của promotor được đề xuất theo sáng chế cũng như sáu điểm được xác định ban đầu.

Ví dụ 5: Thử nghiệm đưa đột biến vào promotor GSH1 (2)

Dựa vào các kết quả được xác nhận trong các ví dụ được mô tả ở trên, thử nghiệm được thực hiện để xác định xem khả năng sản sinh glutathion có được tăng cường bằng cách đưa đột biến vào chỉ một vài vị trí hay không. Cụ thể, đột biến được đưa vào một điểm tại vị trí thứ $-250 (C \rightarrow T)$ (đột biến tại một điểm (1)) hoặc tại vị trí thứ $-252 (G \rightarrow A)$ (đột biến tại một điểm (2)) và hai điểm ở cả hai vị trí trong các chủng CEN.PK1-D và CJ-5, và khả năng sản sinh glutathion của chúng được đo và thể hiện trong các bảng 9 và 10.

Để đạt được điều này, các chủng được điều chế theo cách tương tự trong ví dụ 3, ngoại trừ gen của phân đoạn bao gồm vùng phía trước ORF GSH1 chứa các đột biến tại một điểm hoặc hai điểm và vùng ORF GSH1 được tổng hợp, và sau đó PCR được thực hiện bằng cách sử dụng cặp mồi có mã nhận biết SEQ ID NO: 34 và SEQ ID NO: 37 để nhờ đó thu được đoạn của vùng phía trước ORF GSH1 bao gồm trình tự enzym giới hạn BamHI đầu N, trình tự enzym giới hạn XhoI đầu C, và đột biến tại một điểm hoặc hai điểm.

Bảng 9

Vật	Đột biến	#	10 giờ	26 giờ	32 giờ
-----	----------	---	--------	--------	--------

chủ			OD ₆₀₀	OD ₆₀₀	GSH (mg/L)	Hàm lượng GSH (%)	OD ₆₀₀	GSH (mg/L)	Hàm lượng GSH (%)
CJ-5	Đối chứng	1	30,2	47,8	266,4	2,7	56,8	267,1	2,3
		2	30,0	53,4	256,1	2,3	55,6	266,0	2,3
		Trung bình	30,1	50,6	261,2	2,5	56,2	266,5	2,3
	Promotor GSH1, đột biến tại 1 điểm (1)	1	30,8	53,2	253,9	2,3	53,2	268,9	2,5
		2	30,8	53,0	257,0	2,4	53,6	269,6	2,4
		Trung bình	30,8	53,1	255,4	2,3	53,4	269,3	2,4
	Promotor GSH1, đột biến tại 1 điểm (2)	1	28,8	52,2	253,9	2,4	53,2	268,9	2,5
		2	29,8	51,0	257,0	2,4	53,6	269,6	2,4
		Trung bình	29,3	51,6	255,4	2,4	53,4	269,3	2,4
	Promotor GSH1, đột biến tại 2 điểm	1	30,2	53,8	297,6	2,7	54,4	298,8	2,7
		2	30,4	57,6	299,0	2,5	53,0	292,4	2,7
		Trung bình	30,3	55,7	298,3	2,6	53,7	295,6	2,7

Bảng 10

Vật chủ	Đột biến	#	10 giờ	26 giờ			32 giờ		
			OD ₆₀₀	OD ₆₀₀	GSH (mg/L)	Hàm lượng GSH (%)	OD ₆₀₀	GSH (mg/L)	Hàm lượng GSH (%)
CEN.P K1-D	Đối chứng	1	37,2	51,4	84,4	0,8	50,6	96,1	0,9
		2	36,2	51,6	82,2	0,8	52,0	92,6	0,9
		Trung bình	36,7	51,5	83,3	0,8	51,3	94,4	0,9
	Promotor GSH1, đột biến tại 1 điểm (1)	1	37,5	53,8	85,0	0,8	52,2	99,2	0,9
		2	36,8	53,7	94,5	0,9	54,1	95,5	0,9
		Trung bình	37,2	53,8	89,7	0,8	53,2	97,3	0,9
	Promotor GSH1, đột biến tại 1 điểm (2)	1	37,8	58,8	95,0	0,8	53,2	91,0	0,8
		2	37,2	57,2	90,5	0,8	50,8	105,5	1,0
		Trung bình	37,5	58,0	92,7	0,8	52,0	98,2	0,9
	Promotor GSH1, đột biến tại 2 điểm	1	37,2	50,6	109,8	1,1	53,6	132,0	1,2
		2	38,8	48,0	106,9	1,1	54,8	122,0	1,1
		Trung	38,0	49,3	108,3	1,1	54,2	127,0	1,1

		bình							
--	--	------	--	--	--	--	--	--	--

Theo kết quả của thử nghiệm, khẳng định rằng khả năng sản sinh glutathion được tăng cường bằng cách đưa đột biến vào chỉ một số điểm.

Dựa vào đó, có thể khẳng định rằng khả năng sản sinh glutathion được tăng cường đáng kể nhờ đột biến được đưa vào chỉ một số vị trí của promotor được đề xuất bởi sáng chế cũng như sáu vị trí được xác định ban đầu.

Ví dụ 6: Thử nghiệm để đưa đột biến vào promotor GSH1 (3)

Dựa vào kết quả được xác định trong các ví dụ mô tả ở trên, thử nghiệm được thực hiện để xác định xem khả năng sản sinh glutathion có được tăng cường bằng cách đưa đột biến vào chỉ một số vị trí hay không.

Cụ thể, đột biến được đưa vào bốn điểm tại vị trí thứ -398, -399, -407, và -409 (-398 (A→T), -399 (A→C), -407 (T→C), và -409 (T→C)) độc lập hoặc kết hợp với nhau.

Các đột biến như sau.

- 1) đột biến tại một điểm (1): GSH1 -398 (A→T)
- 2) đột biến tại một điểm (2): GSH1 -399 (A→C)
- 3) đột biến tại một điểm (3): GSH1 -407 (T→C)
- 4) đột biến tại một điểm (4): GSH1 -409 (T→C)
- 5) đột biến tại hai điểm (1): GSH1 -398 (A→T) và -399 (A→C)
- 6) đột biến tại hai điểm (2): GSH1 -398 (A→T) và -407 (T→C)
- 7) đột biến tại hai điểm (3): GSH1 -398 (A→T) và -409 (T→C)
- 8) đột biến tại hai điểm (4): GSH1 -399 (A→C) và -407 (T→C)
- 9) đột biến tại hai điểm (5): GSH1 -399 (A→C) và -409 (T→C)
- 10) đột biến tại hai điểm (6): GSH1 -407 (T→C) và -409 (T→C)
- 11) đột biến tại bốn điểm: GSH1 -398 (A→T), -399 (A→C), -407 (T→C), và -409 (T→C)

Để đạt được điều này, các chủng được điều chế theo cách tương tự như trong ví dụ 3, ngoại trừ gen của phân đoạn chứa vùng phía trước ORF GSH1 gồm đột biến tại một

điểm, hai điểm, hoặc bốn điểm và vùng ORF GSH1 được tổng hợp, và sau đó PCR được thực hiện sử dụng cặp mồi có mã nhận biết SEQ ID NO: 34 và SEQ ID NO: 37 để nhờ đó thu được phân đoạn của vùng phía trước ORF GSH1 bao gồm trình tự enzym giới hạn BamHI đầu N, trình tự enzym giới hạn XhoI đầu C, và đột biến tại một điểm, hai điểm hoặc bốn điểm.

Khả năng sản sinh glutathion của các chủng được xác định, và các kết quả được thể hiện trong bảng 11 và 12 bên dưới.

Bảng 11

Vật chủ	Đột biến	#	10 giờ	26 giờ			32 giờ		
			OD ₆₀₀	OD ₆₀₀	GSH (mg/L)	Hàm lượng GSH (%)	OD ₆₀₀	GSH (mg/L)	Hàm lượng GSH (%)
CJ-5	Đối chứng	1	30,2	47,8	266,4	2,7	56,8	267,1	2,3
		2	30,0	53,4	256,1	2,3	55,6	266,0	2,3
		Trung bình	30,1	50,6	261,2	2,5	56,2	266,5	2,3
	Promotor GSH1, đột biến tại một điểm (1)	1	27,6	52,0	267,2	2,5	54,4	267,6	2,4
		2	27,4	52,4	251,3	2,3	53,4	261,8	2,4
		Trung bình	27,5	52,2	259,3	2,4	53,9	264,7	2,4
	Promotor GSH1, đột biến tại một điểm (2)	1	30,0	54,8	268,8	2,4	56,0	284,3	2,5
		2	27,8	55,4	259,0	2,3	56,2	272,7	2,4
		Trung bình	28,9	55,1	263,9	2,3	56,1	278,5	2,4
	Promotor GSH1, đột biến tại một điểm (3)	1	27,0	52,4	270,2	2,5	52,6	268,2	2,5
		2	24,4	50,0	263,9	2,6	54,8	256,2	2,3
		Trung bình	25,7	51,2	267,1	2,5	53,7	262,2	2,4
	Promotor GSH1, đột biến tại một điểm (4)	1	36,0	60,2	267,7	2,2	59,6	268,9	2,2
		2	28,8	53,6	263,2	2,4	54,8	266,5	2,4
		Trung bình	32,4	56,9	265,5	2,3	57,2	267,7	2,3
	Promotor GSH1, đột biến tại hai điểm (1)	1	39,8	55,4	301,8	2,6	58,6	327,8	2,7
		2	30,0	55,0	305,0	2,7	54,2	304,0	2,7
		Trung bình	34,9	55,2	303,4	2,7	56,4	315,9	2,7
	Promotor GSH1, đột biến tại một điểm (2)	1	27,8	55,4	266,4	2,3	54,2	268,4	2,4
		2	28,8	56,8	269,9	2,3	55,0	272,2	2,4

	biến tại hai điểm (2)	Trung bình	28,3	56,1	268,2	2,3	54,6	270,3	2,4
	Promotor GSH1, đột biến tại hai điểm (3)	1	29,0	54,8	275,7	2,4	57,4	274,4	2,3
		2	29	52,0	268,0	2,5	54,4	269,1	2,4
		Trung bình	29,0	53,4	271,9	2,5	55,9	271,8	2,4
	Promotor GSH1, đột biến tại hai điểm (4)	1	30,0	53,4	284,7	2,6	55,2	285,2	2,5
		2	26,8	52,8	363,6	2,4	54,4	269,4	2,4
		Trung bình	28,4	53,1	274,2	2,5	54,8	277,3	2,5
	Promotor GSH1, đột biến tại hai điểm (5)	1	29,0	50,0	274,5	2,7	52,4	276,9	2,6
		2	29,8	54,2	271,4	2,4	55,4	276,7	2,4
		Trung bình	29,4	52,1	272,9	2,5	53,9	276,8	2,5
	Promotor GSH1, đột biến tại hai điểm (6)	1	30,2	52,0	309,9	2,9	54,4	308,1	2,7
		2	29,6	56,2	300,2	2,6	53,8	306,9	2,8
		Trung bình	29,9	54,1	305,1	2,7	54,1	307,5	2,8
	Promotor GSH1, đột biến tại bốn điểm	1	31,2	52,4	328,8	3,0	57,2	326,6	2,8
		2	40,6	57,8	345,8	2,9	66,0	344,9	2,5
		Trung bình	35,9	55,1	337,3	3,0	61,6	335,7	2,7

Bảng 12

Vật chủ	Đột biến	#	10 giờ	26 giờ			32 giờ		
			OD ₆₀₀	OD ₆₀₀	GSH (mg/L)	Hàm lượng GSH (%)	OD ₆₀₀	GSH (mg/L)	Hàm lượng GSH (%)
CENP K1-D	Đôi chứng	1	37,2	51,4	84,4	0,8	50,6	96,1	0,9
		2	36,2	51,6	82,2	0,8	52,0	92,6	0,9
		Trung bình	36,7	51,5	83,3	0,8	51,3	94,4	0,9
	Promotor GSH1, đột biến tại một điểm (1)	1	40,6	55,6	89,2	0,8	55,8	90,2	0,8
		2	40,6	56,0	87,5	0,8	58,6	92,5	0,8
		Trung bình	40,6	55,8	88,3	0,8	57,2	91,3	0,8
	Promotor GSH1, đột biến tại một điểm (2)	1	41,2	58,4	91,4	0,8	57,6	93,4	0,8
		2	41,2	55,2	91,3	0,8	53,6	94,3	0,9
		Trung bình	41,2	56,8	91,3	0,8	55,6	93,8	0,8
	GSH1	1	39,8	54,4	90,0	0,8	58,4	92,0	0,8

Promotor GSH1, đột biến tại một điểm (3)	2	41,0	54,4	89,9	0,8	59,0	90,9	0,7
	Trung bình	40,4	54,4	90,0	0,8	58,7	91,5	0,8
Promotor GSH1, đột biến tại một điểm (4)	1	42,0	57,8	89,1	0,7	56,8	92,1	0,8
	2	41,2	57,8	89,4	0,8	56,4	92,4	0,8
	Trung bình	41,6	57,8	89,3	0,7	56,6	92,3	0,8
Promotor GSH1, đột biến tại hai điểm (1)	1	36,4	49,8	99,8	1,0	51,4	104,5	1,0
	2	36,0	47,0	97,9	1,0	52,4	109,2	1,0
	Trung bình	36,2	48,4	98,9	1,0	51,9	106,9	1,0
Promotor GSH1, đột biến tại hai điểm (2)	1	40,2	55,2	88,0	0,8	53,2	92,0	0,8
	2	40,8	54,2	93,2	0,8	59,4	95,2	0,8
	Trung bình	40,5	54,7	90,6	0,8	56,3	93,6	0,8
Promotor GSH1, đột biến tại hai điểm (3)	1	39,4	53,8	93,1	0,8	54,6	96,1	0,9
	2	40,2	55,2	89,3	0,8	57,0	90,3	0,8
	Trung bình	39,8	54,5	91,2	0,8	55,8	93,2	0,8
Promotor GSH1, đột biến tại hai điểm (4)	1	36,2	48,0	85,5	0,9	51,8	90,1	0,8
	2	35,2	45,6	84,3	0,9	52,4	89,9	0,8
	Trung bình	35,7	46,8	84,9	0,9	52,1	90,0	0,8
Promotor GSH1, đột biến tại hai điểm (5)	1	42,2	55,2	90,7	0,8	60,8	92,7	0,7
	2	42,4	57,8	90,9	0,8	56,6	93,9	0,8
	Trung bình	42,3	56,5	90,8	0,8	58,7	93,3	0,8
Promotor GSH1, đột biến tại hai điểm (6)	1	40,6	52,4	99,1	0,9	57,6	102,1	0,9
	2	41,0	53,0	98,6	0,9	59,4	100,6	0,8
	Trung bình	40,8	52,7	98,9	0,9	58,5	101,4	0,8
Promotor GSH1, đột biến tại bốn điểm	1	37,2	51,4	100,6	0,9	54,2	105,3	0,9
	2	37,0	50,8	102,1	1,0	53,2	105,4	1,0
	Trung bình	37,1	51,1	101,3	1,0	53,7	105,3	1,0

Theo kết quả của thử nghiệm, khẳng định rằng khả năng sản sinh glutathion được tăng cường bằng cách đưa đột biến vào chỉ một vài trong số bốn điểm so với các chủng không có đột biến trong vùng promotor cũng như trường hợp khi các đột biến được đưa vào tất cả bốn điểm. Cụ thể, trong các trường hợp 5) đột biến tại hai điểm (1): GSH1 -398 (A→T) và -399 (A→C) và 10) đột biến tại hai điểm (6): GSH1 -407 (T→C) và

-409 (T→C), khả năng sản sinh glutathion được tăng cường đáng kể khi so với các chủng không có đột biến trong vùng promotor.

Dựa vào đó, có thể khẳng định rằng khả năng sản sinh glutathion được tăng cường đáng kể nhờ đột biến được đưa vào chỉ một vài vị trí của promotor được đề xuất theo sáng chế cũng như tất cả sáu vị trí được xác định ban đầu.

Phần mô tả sáng chế bên trên được cung cấp với mục đích minh họa, và người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật có thể hiểu rằng các thay đổi và sửa đổi khác nhau có thể được thực hiện mà không làm thay đổi nguyên lý kỹ thuật và các đặc điểm kỹ thuật của sáng chế. Do đó, rõ ràng rằng các phương án được mô tả ở trên chỉ mang tính minh họa theo mọi khía cạnh và không làm giới hạn phạm vi bảo hộ của sáng chế. Các phương án khác nhau được bộc lộ ở đây không nhằm mục đích giới hạn phạm vi bảo hộ và nguyên lý kỹ thuật của sáng chế được trình bày trong các yêu cầu bảo hộ dưới đây. Sáng chế chỉ bị giới hạn chỉ bởi các thuật ngữ của yêu cầu bảo hộ kèm theo, cùng với phạm vi đầy đủ của các phương án tương đương nằm trong phạm vi của các yêu cầu bảo hộ.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Polynucleotit có hoạt tính promotor, trong đó ít nhất một nucleotit được lựa chọn từ nhóm gồm có các nucleotit thứ 92, 94, 102, 103, 249, và 251 của trình tự polynucleotit có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2 được thay thế bằng nucleotit khác.
2. Polynucleotit theo điểm 1, trong đó các nucleotit thứ 249 và 251 của polynucleotit có hoạt tính promotor được thay thế bằng các nucleotit khác.
3. Polynucleotit theo điểm 1, trong đó các nucleotit thứ 92, 94, 102, và 103 của polynucleotit có hoạt tính promotor được thay thế bằng các nucleotit khác.
4. Polynucleotit theo điểm 1, trong đó các nucleotit thứ 92, 94, 102, 103, 249, và 251 của polynucleotit có hoạt tính promotor được thay thế bằng các nucleotit khác.
5. Polynucleotit theo điểm 1, trong đó polynucleotit có hoạt tính promotor chỉ bao gồm một trình tự polynucleotit được lựa chọn từ trình tự có mã nhận biết SEQ ID NO: 3 đến SEQ ID NO: 32.
6. Chế phẩm để biểu hiện gen chứa polynucleotit theo điểm bất kỳ từ 1 đến 5.
7. Vectơ chứa polynucleotit theo điểm bất kỳ từ 1 đến 5 và gen mã hóa protein đích.
8. Vectơ theo điểm 7, trong đó protein đích có hoạt tính glutamat-xystein ligaza.
9. Vi sinh vật thuộc chi *Saccharomyces* sp. chứa polynucleotit theo điểm bất kỳ từ 1 đến 5, polynucleotit chứa polynucleotit và gen mã hóa protein đích, hoặc vectơ chứa polynucleotit.
10. Vi sinh vật theo điểm 9, trong đó protein đích là polypeptit có hoạt tính glutamat-xystein ligaza.
11. Phương pháp sản xuất glutathion bao gồm nuôi cấy vi sinh vật theo điểm 9 trong môi trường nuôi cấy.
12. Phương pháp theo điểm 11, phương pháp này còn bao gồm thu hồi glutathion từ ít nhất một được lựa chọn từ vi sinh vật được nuôi cấy, sản phẩm sấy khô của vi sinh vật, chiết xuất của vi sinh vật, sản phẩm nuôi cấy của vi sinh vật, và chất ly giải của vi sinh vật.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

- <110> CJ CheilJedang Corporation
- <120> POLYNUCLEOTIT CÓ HOẠT TÍNH PROMOTO, CHẾ PHẨM, VECTO, VINH SINH VẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT GLUTATHION SỬ DỤNG VI SINH VẬT NÀY
- <130> OPA21012
- <150> KR 10-2020-0041184
- <151> 2020-04-03
- <160> 41
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 499
- <212> DNA
- <213> Chưa biết
- <220>
- <223> *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK-1D

<400> 1

```

ctcttgaatg ggcacagcct attgccccag tggtccctca acaaccttgg tagttggagc      60
gcaattagcg taccctgtac cataactaatt ctcttctgcc caacgacggc tgccattagt      120
cagcatggcg cgcacgtgac tacaactgtg gctggaaacc ttttcgtcct ccccggtttt      180
tcagttagcc gactctacta caatgctttt tcatttttca ctacagaaaaa cctgcaattt      240
gccaaattgg ccatgctctg tgcctccctt gacaaaggac atcttccctg tttataaacg      300
gcggcttacc aaaagttgaa gcttggttctt gcctcttatg agtggagcaa tcgattatat      360
tgaatcgttg tgctggagta gttggatctt tccacgtggt ctgagtcac ttgtagaagc      420
tgaaaattga gcagatttag tatagggcta cattgtaggg tggtttagag tatcgaaaat      480
atacatatag aagaataaa

```

499

- <210> 2
- <211> 500
- <212> DNA
- <213> Chưa biết

- <220>
- <223> *Saccharomyces cerevisiae* CJ-5

<400> 2

```

ctcttgaatg ggcacagcct attgccccag tggtccctca acaaccttgg tagttggagc      60
gcaattagcg taccctgtac cataactaatt ctcttctgcc caacgacggc tgccattagt      120
cagcatggcg cgcacgtgac tacaactgtg gctggaaacc ttttcgtcct ccccggtttt      180
tcagttagcc gactctacta caatgctttt tcatttttca ctacagaaaaa cctgcaattt      240
tccaaattgg ccatgctctg tgcctccctt gacaaaggac atcttccctg tttataaacg      300

```

gcggccttacc aaaagttgaa gcttggttctt gcttcttatg agtggagcaa tcgattatat 360
 tgaatcgttg tgctggagta gttggatctt tccacgtggg ctcgagtcac ttgtagaagc 420
 tgaaaaattg agcaggttta gtatagggct acattgtagg gtggtttaga gtatcgaaaa 480
 tatacatata gaagaataaa 500

<210> 3
 <211> 499
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> S. cerevisiae CEN.PK-1D promoto-đột biến-92 94 102 103 249 251

<400> 3
 ctcttgaatg gcgacagcct attgccccag tgttccctca acaaccttgg tagttggagc 60
 gcaattagcg tatcctgtac catactaatt cccctctgcc cctcgacggc tgccattagt 120
 cagcatggcg cgcacgtgac tacaactgtg gctggaaacc ttttcgtcct ccccggtttt 180
 tcagtgaagg gactctacta caatgctttt tcatttttca ctcagaaaaa cctgcaattt 240
 gccaaattag tcatgctctg tgccctccct gacaaaggac atcttccctg tttataaacg 300
 gcggccttacc aaaagttgaa gcttggttctt gcctcttatg agtggagcaa tcgattatat 360
 tgaatcgttg tgctggagta gttggatctt tccacgtggg ctcgagtcac ttgtagaagc 420
 tgaaaaattg gcagatttag tatagggcta cattgtaggg tggtttagag tatcgaaaaa 480
 atacatatag agaataaa 499

<210> 4
 <211> 499
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> S. cerevisiae CEN.PK-1D promoto-đột biến-92 94 102 103

<400> 4
 ctcttgaatg gcgacagcct attgccccag tgttccctca acaaccttgg tagttggagc 60
 gcaattagcg tatcctgtac catactaatt cccctctgcc cctcgacggc tgccattagt 120
 cagcatggcg cgcacgtgac tacaactgtg gctggaaacc ttttcgtcct ccccggtttt 180
 tcagtgaagg gactctacta caatgctttt tcatttttca ctcagaaaaa cctgcaattt 240
 gccaaattgg ccatgctctg tgccctccct gacaaaggac atcttccctg tttataaacg 300
 gcggccttacc aaaagttgaa gcttggttctt gcctcttatg agtggagcaa tcgattatat 360
 tgaatcgttg tgctggagta gttggatctt tccacgtggg ctcgagtcac ttgtagaagc 420
 tgaaaaattg gcagatttag tatagggcta cattgtaggg tggtttagag tatcgaaaaa 480

atacatatag aagaataaa

499

<210> 5
 <211> 499
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> S. cerevisiae CEN.PK-1D promoto-đột biến-249 251

<400> 5
 ctcttgaatg gcgacagcct attgccccag tgttccctca acaaccttgg tagttggagc 60
 gcaatttagcg tatcctgtac catactaatt ctcttctgcc caacgacggc tgccattagt 120
 cagcatggcg cgcacgtgac tacaactgtg gctggaaacc ttttcgtcct ccccggtttt 180
 tcagttagcc gactctacta caatgctttt tcatttttca ctcagaaaaa cctgcaattt 240
 gccaaatttag tcatgctctg tgctccctt gacaaaggac atcttccctg tttataaacg 300
 gcggcttacc aaaagttgaa gcttgttctt gcctcttatg agtggagcaa tcgattatat 360
 tgaatcgttg tgctggagta gttggatctt tccacgtggc ctcgagtcac ttgtagaagc 420
 tgaaaattga gcagatttag tatagggcta cattgtaggg tggtttagag tatcgaaaat 480
 atacatatag aagaataaa 499

<210> 6
 <211> 499
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> S. cerevisiae CEN.PK-1D promoto-đột biến-102 103

<400> 6
 ctcttgaatg gcgacagcct attgccccag tgttccctca acaaccttgg tagttggagc 60
 gcaatttagcg tatcctgtac catactaatt ctcttctgcc ctcgacggc tgccattagt 120
 cagcatggcg cgcacgtgac tacaactgtg gctggaaacc ttttcgtcct ccccggtttt 180
 tcagttagcc gactctacta caatgctttt tcatttttca ctcagaaaaa cctgcaattt 240
 gccaaattgg ccatgctctg tgctccctt gacaaaggac atcttccctg tttataaacg 300
 gcggcttacc aaaagttgaa gcttgttctt gcctcttatg agtggagcaa tcgattatat 360
 tgaatcgttg tgctggagta gttggatctt tccacgtggc ctcgagtcac ttgtagaagc 420
 tgaaaattga gcagatttag tatagggcta cattgtaggg tggtttagag tatcgaaaat 480
 atacatatag aagaataaa 499

<210> 7
 <211> 499

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> S. cerevisiae CEN.PK-1D promoto-đột biến-92 102

<400> 7

```

ctcttgaatg gcgacagcct attgccccag tgttccctca acaaccttgg tagttggagc      60
gcaattagcg tctcctgtac cataactaatt cccttctgcc ccacgacggc tgccattagt      120
cagcatggcg cgcacgtgac tacaactgtg gctggaaacc ttttcgtcct ccccggtttt      180
tcagtgagcc gactctacta caatgctttt tcatttttca ctcagaaaaa cctgcaattt      240
gccaaattgg ccatgctctg tgctccctt gacaaaggac atcttccttg tttataaacg      300
gcggcttacc aaaagttgaa gcttgcttct gcctcttatg agtggagcaa tcgattatat      360
tgaatcgttg tgctggagta gttggatctt tccacgtggg ctcgagtcac ttgtagaagc      420
tgaaaattga gcagatttag tatagggcta cattgtaggg tggtttagag tatcgaaaat      480
atacatatag aagaataaa                                         499

```

<210> 8

<211> 499

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> S. cerevisiae CEN.PK-1D promoto-đột biến-92 103

<400> 8

```

ctcttgaatg gcgacagcct attgccccag tgttccctca acaaccttgg tagttggagc      60
gcaattagcg tctcctgtac cataactaatt cccttctgcc ccacgacggc tgccattagt      120
cagcatggcg cgcacgtgac tacaactgtg gctggaaacc ttttcgtcct ccccggtttt      180
tcagtgagcc gactctacta caatgctttt tcatttttca ctcagaaaaa cctgcaattt      240
gccaaattgg ccatgctctg tgctccctt gacaaaggac atcttccttg tttataaacg      300
gcggcttacc aaaagttgaa gcttgcttct gcctcttatg agtggagcaa tcgattatat      360
tgaatcgttg tgctggagta gttggatctt tccacgtggg ctcgagtcac ttgtagaagc      420
tgaaaattga gcagatttag tatagggcta cattgtaggg tggtttagag tatcgaaaat      480
atacatatag aagaataaa                                         499

```

<210> 9

<211> 499

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> S. cerevisiae CEN.PK-1D promoto-đột biến-94 102

<400> 9
 ctcttgaatg gcgacagcct attgccccag tgttccctca acaaccttgg tagttggagc 60
 gcaattagcg tctcctgtac cataactaatt ctctcttgcc ccacgacggc tgccattagt 120
 cagcatggcg cgcacgtgac tacaactgtg gctggaaacc ttttcgtcct ccccggtttt 180
 tcagtgagecc gactctacta caatgctttt tcatttttca ctgagaaaaa cctgcaattt 240
 gccaaattgg ccatgctctg tgctccctt gacaaaggac atcttccctg tttataaacg 300
 gcggcttacc aaaagttgaa gcttggttctt gcctcttatg agtggagcaa tcgattatat 360
 tgaatcgttg tgctggagta gttggatctt tccacgtggg ctgagtcac ttgtagaagc 420
 tgaaaattga gcagatttag tatagggcta cattgtaggg tggtttagag tatcgaaaat 480
 atacatatag aagaataaa 499

<210> 10
 <211> 499
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> S. cerevisiae CEN.PK-1D promoto-đột biến-94 103

<400> 10
 ctcttgaatg gcgacagcct attgccccag tgttccctca acaaccttgg tagttggagc 60
 gcaattagcg tctcctgtac cataactaatt ctctcttgcc catcgacggc tgccattagt 120
 cagcatggcg cgcacgtgac tacaactgtg gctggaaacc ttttcgtcct ccccggtttt 180
 tcagtgagecc gactctacta caatgctttt tcatttttca ctgagaaaaa cctgcaattt 240
 gccaaattgg ccatgctctg tgctccctt gacaaaggac atcttccctg tttataaacg 300
 gcggcttacc aaaagttgaa gcttggttctt gcctcttatg agtggagcaa tcgattatat 360
 tgaatcgttg tgctggagta gttggatctt tccacgtggg ctgagtcac ttgtagaagc 420
 tgaaaattga gcagatttag tatagggcta cattgtaggg tggtttagag tatcgaaaat 480
 atacatatag aagaataaa 499

<210> 11
 <211> 499
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> S. cerevisiae CEN.PK-1D promoto-đột biến-92 94

<400> 11
 ctcttgaatg gcgacagcct attgccccag tgttccctca acaaccttgg tagttggagc 60
 gcaattagcg tctcctgtac cataactaatt cccctctgcc caacgacggc tgccattagt 120

cagcatggcg cgcacgtgac tacaactgtg gctggaaacc ttttcgtcct ccccggtttt 180
 tcagttagcc gactctacta caatgctttt tcattttttca ctcagaaaaa cctgcaattt 240
 gccaaattgg ccatgctctg tgcctccctt gacaaaggac atcttccctg tttataaacg 300
 gcggcttacc aaaagttgaa gcttgttctt gcctcttatg agtggagcaa tcgattatat 360
 tgaatcgttg tgctggagta gttggatctt tccacgtggc ctcgagtcac ttgtagaagc 420
 tgaaaattga gcagatttag tatagggcta cattgtaggg tggtttagag tatcgaaaat 480
 atacatatag aagaataaa 499

<210> 12
 <211> 499
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> S. cerevisiae CEN.PK-1D promoto-đột biến-249

<400> 12
 ctcttgaatg gcgacagcct attgccccag tgttccctca acaaccttgg tagttggagc 60
 gcaattagcg taccctgtac cataactaatt ctcttctgcc caacgacggc tgccattagt 120
 cagcatggcg cgcacgtgac tacaactgtg gctggaaacc ttttcgtcct ccccggtttt 180
 tcagttagcc gactctacta caatgctttt tcattttttca ctcagaaaaa cctgcaattt 240
 gccaaattag ccatgctctg tgcctccctt gacaaaggac atcttccctg tttataaacg 300
 gcggcttacc aaaagttgaa gcttgttctt gcctcttatg agtggagcaa tcgattatat 360
 tgaatcgttg tgctggagta gttggatctt tccacgtggc ctcgagtcac ttgtagaagc 420
 tgaaaattga gcagatttag tatagggcta cattgtaggg tggtttagag tatcgaaaat 480
 atacatatag aagaataaa 499

<210> 13
 <211> 499
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> S. cerevisiae CEN.PK-1D promoto-đột biến-251

<400> 13
 ctcttgaatg gcgacagcct attgccccag tgttccctca acaaccttgg tagttggagc 60
 gcaattagcg taccctgtac cataactaatt ctcttctgcc caacgacggc tgccattagt 120
 cagcatggcg cgcacgtgac tacaactgtg gctggaaacc ttttcgtcct ccccggtttt 180
 tcagttagcc gactctacta caatgctttt tcattttttca ctcagaaaaa cctgcaattt 240
 gccaaattgg ccatgctctg tgcctccctt gacaaaggac atcttccctg tttataaacg 300

gcggccttacc aaaagttgaa gcttggttctt gcctcttatg agtggagcaa tgcattatat 360
 tgaatcgttg tgctggagta gttggatctt tccacgtggt ctcgagtcac ttgtagaagc 420
 tgaaaattga gcagatttag tatagggcta cattgtaggg tggtttagag tatcgaaaat 480
 atacatatag aagaataaa 499

<210> 14
 <211> 499
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> S. cerevisiae CEN.PK-1D promoter-đột biến-92

<400> 14
 ctcttgaatg gcgacagcct attgccccag tgttccctca acaaccttgg tagttggagc 60
 gcaattagcg tctcctgtac catactaatt ccctctctgcc caacgacggc tgccattagt 120
 cagcatggcg cgcacgtgac tacaactgtg gctggaaacc ttttcgtcct ccccggtttt 180
 tcagttagcc gactctacta caatgctttt tcatttttca ctgagaaaaa cctgcaattt 240
 gccaaattgg ccatgctctg tgccctccctt gacaaaggac atcttccctg ttataaaacg 300
 gcggccttacc aaaagttgaa gcttggttctt gcctcttatg agtggagcaa tgcattatat 360
 tgaatcgttg tgctggagta gttggatctt tccacgtggt ctcgagtcac ttgtagaagc 420
 tgaaaattga gcagatttag tatagggcta cattgtaggg tggtttagag tatcgaaaat 480
 atacatatag aagaataaa 499

<210> 15
 <211> 499
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> S. cerevisiae CEN.PK-1D promoter-đột biến-94

<400> 15
 ctcttgaatg gcgacagcct attgccccag tgttccctca acaaccttgg tagttggagc 60
 gcaattagcg tctcctgtac catactaatt ctctctctgcc caacgacggc tgccattagt 120
 cagcatggcg cgcacgtgac tacaactgtg gctggaaacc ttttcgtcct ccccggtttt 180
 tcagttagcc gactctacta caatgctttt tcatttttca ctgagaaaaa cctgcaattt 240
 gccaaattgg ccatgctctg tgccctccctt gacaaaggac atcttccctg ttataaaacg 300
 gcggccttacc aaaagttgaa gcttggttctt gcctcttatg agtggagcaa tgcattatat 360
 tgaatcgttg tgctggagta gttggatctt tccacgtggt ctcgagtcac ttgtagaagc 420
 tgaaaattga gcagatttag tatagggcta cattgtaggg tggtttagag tatcgaaaat 480

atacatatag aagaataaa

499

<210> 16
 <211> 499
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> S. cerevisiae CEN.PK-1D promoto-đột biến-102

<400> 16
 ctcttgaatg gcgacagcct attgccccag tgttccctca acaaccttgg tagttggagc 60
 gcaattagcg tatcctgtac catactaatt ctcttctgcc ccacgacggc tgccattagt 120
 cagcatggcg cgcacgtgac tacaactgtg gctggaaacc ttttcgtcct ccccggtttt 180
 tcagtgagcc gactctacta caatgctttt tcatttttca ctcagaaaaa cctgcaattt 240
 gccaaattgg ccatgctctg tgccctccctt gacaaaggac atcttccctg tttataaacg 300
 gcggcttacc aaaagttgaa gcttggttctt gcctcttatg agtggagcaa tcgattatat 360
 tgaatcgttg tgctggagta gttggatctt tccacgtggc ctcgagtcac ttgtagaagc 420
 tgaaaattga gcagatttag tatagggcta cattgtaggg tggtttagag tatcgaaaat 480
 atacatatag aagaataaa 499

<210> 17
 <211> 499
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> S. cerevisiae CEN.PK-1D promoto-đột biến-103

<400> 17
 ctcttgaatg gcgacagcct attgccccag tgttccctca acaaccttgg tagttggagc 60
 gcaattagcg tatcctgtac catactaatt ctcttctgcc catcgacggc tgccattagt 120
 cagcatggcg cgcacgtgac tacaactgtg gctggaaacc ttttcgtcct ccccggtttt 180
 tcagtgagcc gactctacta caatgctttt tcatttttca ctcagaaaaa cctgcaattt 240
 gccaaattgg ccatgctctg tgccctccctt gacaaaggac atcttccctg tttataaacg 300
 gcggcttacc aaaagttgaa gcttggttctt gcctcttatg agtggagcaa tcgattatat 360
 tgaatcgttg tgctggagta gttggatctt tccacgtggc ctcgagtcac ttgtagaagc 420
 tgaaaattga gcagatttag tatagggcta cattgtaggg tggtttagag tatcgaaaat 480
 atacatatag aagaataaa 499

<210> 18
 <211> 500
 <212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> S. cerevisiae CJ-5 promoter-đột biến-92 94 102 103 249 251

<400> 18

```
ctcttgaatg gcgacagcct attgcctcag tgttccctca acaaccttgg tagttggagc      60
gcaattagcg tctcctgtac cataactaatt cccctctgcc cctcgacggc tgccattagt      120
cagcatggcg cgcacgtgac tacaactgtg gctggaaacc ttttcgtcct ccccggtttt      180
tcagtgagcc gactctacta caatgctttt tcatttttca ctcaaaaaa cctgcaattt      240
tccaaattag tcatgctctg tgcctccctt gacaaaggac atcttccctg tttataaacg      300
gcggtttacc aaaagttgaa gcttggttctt gcttcttatg agtggagcaa tcgattatat      360
tgaatcgttg tgctggagta gttggatctt tccacgtggc ctcgagtcac ttgtagaagc      420
tgaaaaattg agcaggttta gtatagggc acattgtagg gtgggtttaga gtatcgaataa      480
tatacatata gaagaataaa                                         500
```

<210> 19

<211> 500

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> S. cerevisiae CJ-5 promoter-đột biến-92 94 102 103

<400> 19

```
ctcttgaatg gcgacagcct attgcctcag tgttccctca acaaccttgg tagttggagc      60
gcaattagcg tctcctgtac cataactaatt cccctctgcc cctcgacggc tgccattagt      120
cagcatggcg cgcacgtgac tacaactgtg gctggaaacc ttttcgtcct ccccggtttt      180
tcagtgagcc gactctacta caatgctttt tcatttttca ctcaaaaaa cctgcaattt      240
tccaaattgg ccatgctctg tgcctccctt gacaaaggac atcttccctg tttataaacg      300
gcggtttacc aaaagttgaa gcttggttctt gcttcttatg agtggagcaa tcgattatat      360
tgaatcgttg tgctggagta gttggatctt tccacgtggc ctcgagtcac ttgtagaagc      420
tgaaaaattg agcaggttta gtatagggc acattgtagg gtgggtttaga gtatcgaataa      480
tatacatata gaagaataaa                                         500
```

<210> 20

<211> 500

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> S. cerevisiae CJ-5 promoter-đột biến-249 251

<400> 20
 ctcttgaatg gcgacagcct attgcctcag tgttccctca acaaccttgg tagttggagc 60
 gcaattagcg tatcctgtac cataactaatt ctcttctgcc caacgacggc tgccattagt 120
 cagcatggcg cgcacgtgac tacaactgtg gctggaaacc ttttcgtcct ccccggtttt 180
 tcagtgagec gactctacta caatgctttt tcattttttca ctcagaaaaa cctgcaattt 240
 tccaaattag tcatgctctg tgcctccctt gacaaaggac atcttccctg tttataaacg 300
 gcggcttacc aaaagttgaa gcttgttctt gcttcttatg agtggagcaa tcgattatat 360
 tgaatcgttg tgctggagta gttggatctt tccacgtggc ctcgagtcac ttgtagaagc 420
 tgaaaaattg agcagggtta gtatagggt acattgtagg gtgggtttaga gtatcgaaaa 480
 tatacatata gaagaataaa 500

<210> 21
 <211> 500
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> S. cerevisiae CJ-5 promoto-đột biến-102 103

<400> 21
 ctcttgaatg gcgacagcct attgcctcag tgttccctca acaaccttgg tagttggagc 60
 gcaattagcg tatcctgtac cataactaatt ctcttctgcc cctcgacggc tgccattagt 120
 cagcatggcg cgcacgtgac tacaactgtg gctggaaacc ttttcgtcct ccccggtttt 180
 tcagtgagec gactctacta caatgctttt tcattttttca ctcagaaaaa cctgcaattt 240
 tccaaattgg ccatgctctg tgcctccctt gacaaaggac atcttccctg tttataaacg 300
 gcggcttacc aaaagttgaa gcttgttctt gcttcttatg agtggagcaa tcgattatat 360
 tgaatcgttg tgctggagta gttggatctt tccacgtggc ctcgagtcac ttgtagaagc 420
 tgaaaaattg agcagggtta gtatagggt acattgtagg gtgggtttaga gtatcgaaaa 480
 tatacatata gaagaataaa 500

<210> 22
 <211> 500
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> S. cerevisiae CJ-5 promoto-đột biến-92 102

<400> 22
 ctcttgaatg gcgacagcct attgcctcag tgttccctca acaaccttgg tagttggagc 60
 gcaattagcg tatcctgtac cataactaatt cccttctgcc ccacgacggc tgccattagt 120
 cagcatggcg cgcacgtgac tacaactgtg gctggaaacc ttttcgtcct ccccggtttt 180

tcagtgagcc gactctacta caatgctttt tcattttttca ctcagaaaaa cctgcaattt 240
 tccaaattgg ccatgctctg tgccctccctt gacaaaggac atcttccctg tttataaacg 300
 gcggccttacc aaaagttgaa gcttggttctt gcttcttatg agtggagcaa tcgattatat 360
 tgaatcgttg tgctggagta gttggatctt tccacgtggt ctgagtcac ttgtagaagc 420
 tgaaaaattg agcagggttta gtatagggct acattgtagg gtgggtttaga gtatcgaaaa 480
 tatacatata gaagaataaa 500

<210> 23
 <211> 500
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> S. cerevisiae CJ-5 promoto-đột biến-92 103

<400> 23
 ctcttgaatg gcgacagcct attgcctcag tgttccctca acaaccttgg tagttggagc 60
 gcaattagcg tatcctgtac cataactaatt ccttctgccc catcgacggc tgccattagt 120
 cagcatggcg cgcacgtgac tacaactgtg gctggaaacc ttttcgtcct ccccggtttt 180
 tcagtgagcc gactctacta caatgctttt tcattttttca ctcagaaaaa cctgcaattt 240
 tccaaattgg ccatgctctg tgccctccctt gacaaaggac atcttccctg tttataaacg 300
 gcggccttacc aaaagttgaa gcttggttctt gcttcttatg agtggagcaa tcgattatat 360
 tgaatcgttg tgctggagta gttggatctt tccacgtggt ctgagtcac ttgtagaagc 420
 tgaaaaattg agcagggttta gtatagggct acattgtagg gtgggtttaga gtatcgaaaa 480
 tatacatata gaagaataaa 500

<210> 24
 <211> 500
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> S. cerevisiae CJ-5 promoto-đột biến-94 102

<400> 24
 ctcttgaatg gcgacagcct attgcctcag tgttccctca acaaccttgg tagttggagc 60
 gcaattagcg tatcctgtac cataactaatt ctctctgccc ccacgacggc tgccattagt 120
 cagcatggcg cgcacgtgac tacaactgtg gctggaaacc ttttcgtcct ccccggtttt 180
 tcagtgagcc gactctacta caatgctttt tcattttttca ctcagaaaaa cctgcaattt 240
 tccaaattgg ccatgctctg tgccctccctt gacaaaggac atcttccctg tttataaacg 300
 gcggccttacc aaaagttgaa gcttggttctt gcttcttatg agtggagcaa tcgattatat 360

tgaatcgttg tgctggagta gttggatctt tccacgtggt ctcgagtcac ttgtagaagc 420
 tgaaaaattg agcagggtta gtatagggct acattgtagg gtggttttaga gtatcgaaaa 480
 tatacatata gaagaataaa 500

<210> 25
 <211> 500
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> S. cerevisiae CJ-5 promoter-đột biến-94 103

<400> 25
 ctcttgaatg ggcacagcct attgcctcag tgttccctca acaaccttgg tagttggagc 60
 gcaattagcg tctcctgtac cataactaatt ctctcttgcc catcgacggc tgccattagt 120
 cagcatggcg cgcacgtgac tacaactgtg gctggaaacc ttttcgtcct ccccggtttt 180
 tcagtgaagg gactctacta caatgctttt tcatttttca ctgagaaaaa cctgcaattt 240
 tccaaatttg ccatgctctg tgcctccctt gacaaaggac atcttccctg tttataaacg 300
 gcggcttacc aaaagttgaa gcttgttctt gcttcttatg agtggagcaa tcgattatat 360
 tgaatcgttg tgctggagta gttggatctt tccacgtggt ctcgagtcac ttgtagaagc 420
 tgaaaaattg agcagggtta gtatagggct acattgtagg gtggttttaga gtatcgaaaa 480
 tatacatata gaagaataaa 500

<210> 26
 <211> 500
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> S. cerevisiae CJ-5 promoter-đột biến-92 94

<400> 26
 ctcttgaatg ggcacagcct attgcctcag tgttccctca acaaccttgg tagttggagc 60
 gcaattagcg tctcctgtac cataactaatt cctctctgcc caacgacggc tgccattagt 120
 cagcatggcg cgcacgtgac tacaactgtg gctggaaacc ttttcgtcct ccccggtttt 180
 tcagtgaagg gactctacta caatgctttt tcatttttca ctgagaaaaa cctgcaattt 240
 tccaaatttg ccatgctctg tgcctccctt gacaaaggac atcttccctg tttataaacg 300
 gcggcttacc aaaagttgaa gcttgttctt gcttcttatg agtggagcaa tcgattatat 360
 tgaatcgttg tgctggagta gttggatctt tccacgtggt ctcgagtcac ttgtagaagc 420
 tgaaaaattg agcagggtta gtatagggct acattgtagg gtggttttaga gtatcgaaaa 480
 tatacatata gaagaataaa 500

<210> 27
 <211> 500
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> *S. cerevisiae* CJ-5 promoto-đột biến-249

<400> 27
 ctcttgaatg gcgacagcct attgcctcag tgttccctca acaaccttgg tagttggagc 60
 gcaattagcg tctcctgtac catactaatt ctcttctgcc caacgacggc tgccattagt 120
 cagcatggcg cgcacgtgac tacaactgtg gctggaaacc ttttcgtcct ccccggtttt 180
 tcagtgaagg gactctacta caatgctttt tcatttttca ctcagaaaaa cctgcaattt 240
 tccaaattag ccatgctctg tgcctccctt gacaaaggac atcttccctg tttataaacg 300
 gcggcttacc aaaagttgaa gcttgttctt gcttcttatg agtggagcaa tcgattatat 360
 tgaatcgttg tgctggagta gttggatctt tccacgtggc ctcgagtcac ttgtagaagc 420
 tgaaaaattg agcaggttta gtatagggt acattgtagg gtggttttaga gtatcgaata 480
 tatacatata gaagaataaa 500

<210> 28
 <211> 500
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> *S. cerevisiae* CJ-5 promoto-đột biến-251

<400> 28
 ctcttgaatg gcgacagcct attgcctcag tgttccctca acaaccttgg tagttggagc 60
 gcaattagcg tctcctgtac catactaatt ctcttctgcc caacgacggc tgccattagt 120
 cagcatggcg cgcacgtgac tacaactgtg gctggaaacc ttttcgtcct ccccggtttt 180
 tcagtgaagg gactctacta caatgctttt tcatttttca ctcagaaaaa cctgcaattt 240
 tccaaattgg tcatgctctg tgcctccctt gacaaaggac atcttccctg tttataaacg 300
 gcggcttacc aaaagttgaa gcttgttctt gcttcttatg agtggagcaa tcgattatat 360
 tgaatcgttg tgctggagta gttggatctt tccacgtggc ctcgagtcac ttgtagaagc 420
 tgaaaaattg agcaggttta gtatagggt acattgtagg gtggttttaga gtatcgaata 480
 tatacatata gaagaataaa 500

<210> 29
 <211> 500
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> S. cerevisiae CJ-5 promoto-đột biến-92

<400> 29

```

ctcttgaatg gcgacagcct attgcctcag tgttccctca acaaccttgg tagttggagc      60
gcaattagcg tctcctgtac catactaatt cccttctgcc caacgacggc tgccattagt      120
cagcatggcg cgcacgtgac tacaactgtg gctggaaacc ttttcgtcct ccccggtttt      180
tcagtgagcc gactctacta caatgctttt tcattttttca ctcagaaaaa cctgcaattt      240
tccaaattgg ccatgctctg tgcctccctt gacaaaggac atcttccctg tttataaacg      300
gcggccttacc aaaagttgaa gcttgttctt gcttcttatg agtggagcaa tcgattatat      360
tgaatcgttg tgctggagta gttggatctt tccacgtggc ctcgagtcac ttgtagaagc      420
tgaaaaattg agcagggtta gtatagggtt acattgtagg gtgggtttaga gtatcgaaaa      480
tatacatata gaagaataaa                                         500

```

<210> 30

<211> 500

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> S. cerevisiae CJ-5 promoto-đột biến-94

<400> 30

```

ctcttgaatg gcgacagcct attgcctcag tgttccctca acaaccttgg tagttggagc      60
gcaattagcg tctcctgtac catactaatt ctcctctgcc caacgacggc tgccattagt      120
cagcatggcg cgcacgtgac tacaactgtg gctggaaacc ttttcgtcct ccccggtttt      180
tcagtgagcc gactctacta caatgctttt tcattttttca ctcagaaaaa cctgcaattt      240
tccaaattgg ccatgctctg tgcctccctt gacaaaggac atcttccctg tttataaacg      300
gcggccttacc aaaagttgaa gcttgttctt gcttcttatg agtggagcaa tcgattatat      360
tgaatcgttg tgctggagta gttggatctt tccacgtggc ctcgagtcac ttgtagaagc      420
tgaaaaattg agcagggtta gtatagggtt acattgtagg gtgggtttaga gtatcgaaaa      480
tatacatata gaagaataaa                                         500

```

<210> 31

<211> 500

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> S. cerevisiae CJ-5 promoto-đột biến-102

<400> 31

```

ctcttgaatg gcgacagcct attgcctcag tgttccctca acaaccttgg tagttggagc      60
gcaattagcg tctcctgtac catactaatt ctcttctgcc ccacgacggc tgccattagt      120
cagcatggcg cgcacgtgac tacaactgtg gctggaaacc ttttcgtcct ccccggtttt      180
tcagtgaagg gactctacta caatgctttt tcatttttca ctcagaaaaa cctgcaattt      240
tccaaattgg ccatgctctg tgcctccctt gacaaaggac atcttccctg tttataaacg      300
gcggttacc aaaagttgaa gcttgttctt gcttcttatg agtggagcaa tcgattatat      360
tgaatcggtt tgctggagta gttggatctt tccacgtggc ctcgagtcac ttgtagaagc      420
tgaaaaattg agcaggttta gtatagggtt acattgtagg gtggttttaga gtatcgaaaa      480
tatacatata gaagaataaa                                         500

```

<210> 32
 <211> 500
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> S. cerevisiae CJ-5 promoter-đột biến-103

```

<400> 32
ctcttgaatg gcgacagcct attgcctcag tgttccctca acaaccttgg tagttggagc      60
gcaattagcg tctcctgtac catactaatt ctcttctgcc ctcgacggc tgccattagt      120
cagcatggcg cgcacgtgac tacaactgtg gctggaaacc ttttcgtcct ccccggtttt      180
tcagtgaagg gactctacta caatgctttt tcatttttca ctcagaaaaa cctgcaattt      240
tccaaattgg ccatgctctg tgcctccctt gacaaaggac atcttccctg tttataaacg      300
gcggttacc aaaagttgaa gcttgttctt gcttcttatg agtggagcaa tcgattatat      360
tgaatcggtt tgctggagta gttggatctt tccacgtggc ctcgagtcac ttgtagaagc      420
tgaaaaattg agcaggttta gtatagggtt acattgtagg gtggttttaga gtatcgaaaa      480
tatacatata gaagaataaa                                         500

```

<210> 33
 <211> 678
 <212> PRT
 <213> Saccharomyces cerevisiae

```

<400> 33
Met Gly Leu Leu Ala Leu Gly Thr Pro Leu Gln Trp Phe Glu Ser Arg
 1           5           10           15
Thr Tyr Asn Glu His Ile Arg Asp Glu Gly Ile Glu Gln Leu Leu Tyr
          20           25           30
Ile Phe Gln Ala Ala Gly Lys Arg Asp Asn Asp Pro Leu Phe Trp Gly
          35           40           45
Asp Glu Leu Glu Tyr Met Val Val Asp Phe Asp Asp Lys Glu Arg Asn

```

50	55	60
Ser Met Leu Asp Val Cys His Asp Lys Ile Leu Thr Glu Leu Asn Met		
65	70	75 80
Glu Asp Ser Ser Leu Cys Glu Ala Asn Asp Val Ser Phe His Pro Glu		
	85	90 95
Tyr Gly Arg Tyr Met Leu Glu Ala Thr Pro Ala Ser Pro Tyr Leu Asn		
	100	105 110
Tyr Val Gly Ser Tyr Val Glu Val Asn Met Gln Lys Arg Arg Ala Ile		
	115	120 125
Ala Glu Tyr Lys Leu Ser Glu Tyr Ala Arg Gln Asp Ser Lys Asn Asn		
	130	135 140
Leu His Val Gly Ser Arg Ser Val Pro Leu Thr Leu Thr Val Phe Pro		
145	150	155 160
Arg Met Gly Cys Pro Asp Phe Ile Asn Ile Lys Asp Pro Trp Asn His		
	165	170 175
Lys Asn Ala Ala Ser Arg Ser Leu Phe Leu Pro Asp Glu Val Ile Asn		
	180	185 190
Arg His Val Arg Phe Pro Asn Leu Thr Ala Ser Ile Arg Thr Arg Arg		
	195	200 205
Gly Glu Lys Val Cys Met Asn Val Pro Met Tyr Lys Asp Ile Ala Thr		
	210	215 220
Pro Glu Thr Asp Asp Ser Ile Tyr Asp Arg Asp Trp Phe Leu Pro Glu		
225	230	235 240
Asp Lys Glu Ala Lys Leu Ala Ser Lys Pro Gly Phe Ile Tyr Met Asp		
	245	250 255
Ser Met Gly Phe Gly Met Gly Cys Ser Cys Leu Gln Val Thr Phe Gln		
	260	265 270
Ala Pro Asn Ile Asn Lys Ala Arg Tyr Leu Tyr Asp Ala Leu Val Asn		
	275	280 285
Phe Ala Pro Ile Met Leu Ala Phe Ser Ala Ala Ala Pro Ala Phe Lys		
	290	295 300
Gly Trp Leu Ala Asp Gln Asp Val Arg Trp Asn Val Ile Ser Gly Ala		
305	310	315 320
Val Asp Asp Arg Thr Pro Lys Glu Arg Gly Val Ala Pro Leu Leu Pro		
	325	330 335
Lys Tyr Asn Lys Asn Gly Phe Gly Gly Ile Ala Lys Asp Val Gln Asp		
	340	345 350
Lys Val Leu Glu Ile Pro Lys Ser Arg Tyr Ser Ser Val Asp Leu Phe		
	355	360 365
Leu Gly Gly Ser Lys Phe Phe Asn Arg Thr Tyr Asn Asp Thr Asn Val		
	370	375 380
Pro Ile Asn Glu Lys Val Leu Gly Arg Leu Leu Glu Asn Asp Lys Ala		
385	390	395 400

Pro Leu Asp Tyr Asp Leu Ala Lys His Phe Ala His Leu Tyr Ile Arg
 405 410 415
 Asp Pro Val Ser Thr Phe Glu Glu Leu Leu Asn Gln Asp Asn Lys Thr
 420 425 430
 Ser Ser Asn His Phe Glu Asn Ile Gln Ser Thr Asn Trp Gln Thr Leu
 435 440 445
 Arg Phe Lys Pro Pro Thr Gln Gln Ala Thr Pro Asp Lys Lys Asp Ser
 450 455 460
 Pro Gly Trp Arg Val Glu Phe Arg Pro Phe Glu Val Gln Leu Leu Asp
 465 470 475 480
 Phe Glu Asn Ala Ala Tyr Ser Val Leu Ile Tyr Leu Ile Val Asp Ser
 485 490 495
 Ile Leu Thr Phe Ser Asp Asn Ile Asn Ala Tyr Ile His Met Ser Lys
 500 505 510
 Val Trp Glu Asn Met Lys Ile Ala His His Arg Asp Ala Ile Leu Phe
 515 520 525
 Glu Lys Phe His Trp Lys Lys Ser Phe Arg Asn Asp Thr Asp Val Glu
 530 535 540
 Thr Glu Asp Tyr Ser Ile Ser Glu Ile Phe His Asn Pro Glu Asn Gly
 545 550 555 560
 Ile Phe Pro Gln Phe Val Thr Pro Ile Leu Cys Gln Lys Gly Phe Val
 565 570 575
 Thr Lys Asp Trp Lys Glu Leu Lys His Ser Ser Lys His Glu Arg Leu
 580 585 590
 Tyr Tyr Tyr Leu Lys Leu Ile Ser Asp Arg Ala Ser Gly Glu Leu Pro
 595 600 605
 Thr Thr Ala Lys Phe Phe Arg Asn Phe Val Leu Gln His Pro Asp Tyr
 610 615 620
 Lys His Asp Ser Lys Ile Ser Lys Ser Ile Asn Tyr Asp Leu Leu Ser
 625 630 635 640
 Thr Cys Asp Arg Leu Thr His Leu Asp Asp Ser Lys Gly Glu Leu Thr
 645 650 655
 Ser Phe Leu Gly Ala Glu Ile Ala Glu Tyr Val Lys Lys Asn Lys Pro
 660 665 670
 Ser Ile Glu Ser Lys Cys
 675

<210> 34
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> F_BamHI_GSH1

<400> 34
 ggtaggatcc atgggactct tagctttggg cac 33

<210> 35
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> R_GSH1_C86R

<400> 35
 ttagcctccc taaggacga atcct 25

<210> 36
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> F_GSH1_C86R

<400> 36
 cgtcccttag ggaggctaac gatgt 25

<210> 37
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> R_XhoI_GSH1

<400> 37
 atgactcgag ttaacatttg ctttctattg aaggc 35

<210> 38
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> F_SpeI_GSH1_DW

<400> 38
 tagaactagt actcctttta tttcggttgt gaa 33

<210> 39
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> R_NcoI_GSH1_DW

<400> 39
gctgccatgg gaatagtgtg aaccgataac tgtgt 35

<210> 40
<211> 27
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> R_AL killer

<400> 40
gagcaatgaa cccaataacg aaatctt 27

<210> 41
<211> 24
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> F_BR killer

<400> 41
cttgacgttc gttcgactga tgag 24